



MASTER 2 DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
MENTION: ÉVOLUTION, PATRIMOINE NATUREL ET SOCIÉTÉS
SPÉCIALITÉ: UNITÉ ET DIVERSITÉ DU VIVANT

**PARCOURS: Toxiques, Micro-organismes et Médiateurs Chimiques dans les
Ecosystèmes**

2010 – 2011

Rapport de stage

Etudes des interactions trophiques entre phytophages et impact sur la structure
du réseau trophique des agroécosystèmes de type bananeraie en Martinique via
l'approche code barre ADN.

par
(Guenifi Safia)

Lieu du stage: PRAM
Pôle de Recherche Agroenvironnementale
de la Martinique

Organisme d'accueil: CIRAD
UPR: Systèmes de culture ; bananiers,
plantains et ananas



Directeurs de stage :
Pierre-François Duyck (HDR)
Gregory Mollot (thèses)



Résumé

Les interactions trophiques ont une place importante dans la compréhension du fonctionnement des écosystèmes. La caractérisation du régime alimentaire des espèces animales permet d'étudier ces interactions trophiques. Cette étude est axée autour de deux hypothèses de travail. Premièrement, il s'agit de mettre en évidence un mécanisme de régulation des densités des populations de type "bottom-up". En d'autres termes, la manipulation des ressources basales impacte sur la structure des niveaux trophiques supérieurs (organismes phytophages). Dans ce cas une augmentation de la biodiversité et un changement de régime alimentaire des organismes phytophages sont attendus dans une bananeraie enherbée par *Brachiaria decumbens*, en comparaison à une bananeraie sur sol nu. La seconde hypothèse est qu'il existe une compétition interspécifique pour la ressource disponible. Dans ce cas, l'objectif est de montrer que différentes espèces ont un régime alimentaire proche c'est-à-dire qu'elles consomment la ou les mêmes ressources. La méthode du code barre ADN a été retenue pour la caractérisation des régimes alimentaires. Une région intronique de 40 paires de bases (pb) du gène chloroplastique *trnL*, codant pour un ARN de transfert de la leucine (UAA), a été utilisée comme marqueur moléculaire pour les amplifications des séquences d'ADN végétal présentes dans les contenus stomacaux. Des analyses isotopiques mesurant les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et de $\delta^{15}\text{N}$ ont été réalisées afin de déterminer l'origine de la source de carbone alimentaire des organismes et de mesurer la complexité des réseaux trophiques.

Mots clés: interactions trophique, régulation des écosystèmes, plante de couverture, *Musa spp.*, régulation "bottom-up", régime alimentaire, code barre ADN, gène chloroplastique *trnL*, séquençage, analyses isotopiques.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement Gregory Mollot, avec qui j'ai beaucoup appris au cours de ce stage ; pour son encadrement, son optimisme notamment face aux très longues semaines d'attente pour la réception du matériel de laboratoire (que nous n'avons d'ailleurs toujours pas reçu) et enfin pour ses nombreux conseils tout au long de ce stage.

Je souhaite également remercier Pierre-François Dyuck pour sa disponibilité, l'intérêt qu'il a porté à l'avancé de mes travaux au laboratoire (appréciable de la part d'un écologue de terrain!), son aide pour la rédaction du rapport et son soutien.

J'adresse un remerciement particulier Rémi pour son aide providentielle dans ma compréhension du monde complexe de la mise en page automatique pour la rédaction de mon rapport et à Philippe Ryckewaert pour son aide en entomologie.

Enfin je ne peux oublier toute l'équipe du laboratoire qui m'a accueilli et avec qui j'ai eu plaisir à travailler ainsi que les responsables de mon Master au Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris) qui m'ont permises de faire ce stage.

Listes des figures

Figure 1: Effets possibles de l'ajout d'une plante de couverture sur la structure du réseau trophique et la régulation potentielle des bioagresseurs.....	4
Figure 2: Schématisation du dispositif de piégeage sur la parcelle expérimentale.....	5
Figure 3: Détermination du niveau trophique par $\delta^{15}\text{N}$	10
Figure 4: Position des amorces c, d, g et h sur le gène chloroplastique TrnL (UAA).	12
Figure 5: Position des amorces c et d sur la structure secondaire de l'exon trnL (UAA) (A) et des amorces g et h sur la structure secondaire de l'intron trnL.	12
Figure 6: Diversité et des abondances des taxons échantillonnés sur les deux sols.....	17
Figure 7: Variation isotopiques du carbone et de l'azote sur sol nu et enherbé.	20
Figure 8: Proportion de la source <i>Musa acuminata</i> (une espèce de bananier)..	21
Figure 9: Origine de la source de carbone alternative sur sol E pour <i>Rhinocricidae</i> sp.	22
Figure 10: Origine de la source de carbone alternative sur sol E pour <i>Tenebrionidae</i> sp.....	23
Figure 11: Analyse par électrophorèse des produits PCR testés.....	25
Figure 12: Détection par PCR des séquences trnL amplifiés pour les extraits d'ADN issus des échantillons végétaux (envoyées au séquençage)..	25
Figure 13: Librairie trnL pour le fragment "P6 Loop".	26
Figure 14: Analyse par électrophorèse des produits PCR amplifié par les amorces spécifiques m1 et b2.).....	27
Figure 15: Détection par PCR des séquences trnL amplifiés par les couples d'amorces spécifiques..	28

Liste des tableaux

Tableau 1: Total des échantillons soumis à l'extraction ADN.	8
Tableau 2: Echantillons soumis aux analyses par SMRI.	11
Tableau 3: Séquences des couples d'amorces universelles amplifiant l'intron TrnL (UAA)...	13
Tableau 4: Diversité et Abondance des espèces phytophages piégées dans la parcelle expérimentale.	17
Tableau 5: Diversité et abondance des familles de plantes présentes dans la bananeraie..	18
Tableau 6: Valeurs moyenne de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ (exprimé en ‰) pour les taxons retenus pour les analyses statistiques. N = sol nu, E = sol enherbé, SE= erreur standard.	19
Tableau 7: ANOVA testant l'influence de la variable traitement "sol N/ sol E" sur les variables " $\delta^{13}\text{C}$ " et " $\delta^{15}\text{N}$ ". (au risque $\alpha= 5\%$, résultat significatif *= p-value< 0.05).....	19

Sommaire

I. INTRODUCTION	1
II. OBJECTIFS	3
III. MATERIEL ET METHODES	5
1. Matériel biologique	5
1.1. Site expérimental	5
1.2. Échantillonnage et identification	5
1.2.1. Flore	5
1.2.2. Faune	6
1.3. Extraction ADN	7
1.3.1. Échantillons végétaux	7
1.3.2. Contenus stomacaux	7
2. Analyses isotopiques	8
2.1. Principe	8
2.2. Traitements des échantillons	10
3. Marqueurs moléculaires	11
3.1. Amplification par PCR	11
3.1.1. Mise au point du protocole expérimental	11
3.1.2. Amorces spécifiques	14
3.2. Code barre ADN et séquençage 454	15
3.2.1. Constitution librairie	15
3.2.2. Contenus stomacaux	15
4. Analyses statistiques	16
4.1. Analyses isotopiques	16
4.2. PCR	16
4.3. Code barre ADN	16
IV. RESULTATS	17
1. Échantillonnages	17
1.1. Faune	17
1.2. Flore	18
2. Analyses Isotopiques	19
3. Marqueurs moléculaires	24
3.1. Mise au point du protocole expérimental	24
3.3. Amplification PCR avec amorces spécifiques	27
3.4. Séquençage 454	28
V. DISCUSSION	29
IV. CONCLUSION	34
Références Bibliographiques	36
Liste des abréviations	36
Annexes	39

I. INTRODUCTION

La chlordécone (ou Képone) est un pesticide organochloré de la famille du DDT, un polluant organique persistant (POP). Il a été autorisé pour lutter contre les attaques de charançons du bananier des années 1972 à 1993. Cette substance a été interdite en 1990 en France métropolitaine et en 1993 dans les Antilles françaises (Guadeloupe et Martinique). Les sols contaminés sont à l'origine de pollutions rémanentes des nappes phréatiques, et des autres cultures maraichères et vivrières. Dans ce contexte, il apparaît nécessaire de développer une agriculture économe en intrants chimiques et en énergie, respectueuse de l'environnement et productive. Ainsi, des systèmes de cultures conçus pour augmenter la biodiversité sont à l'étude. Ces nouveaux systèmes de cultures visent à passer de monocultures intensives, qui favorisent souvent le développement des bioagresseurs, vers des agroécosystèmes riches en diversité dans lesquels les bioagresseurs sont régulés par leurs ennemis naturels.

Le concept de réseaux trophique (Elton 1927) permet les espèces à l'étude de l'agroécosystème. De ce point de vue, un agroécosystème est un réseau trophique simplifié, constitué de plantes d'intérêt agronomique, d'insectes herbivores (parfois limité à un seul bioagresseur) et de prédateurs généralistes. L'étude de la structure et du fonctionnement du réseau trophique permet d'évaluer le rôle des différentes espèces de la communauté sur le bioagresseurs, et plus généralement sur le fonctionnement global de l'agroécosystème. Deux mécanismes écologiques sont mis en avant afin d'expliquer les interactions entre les consommateurs et les ressources. La régulation "Top down", ou descendante, fait référence au contrôle de la densité de proies par les prédateurs. Autrement dit, c'est la pression de prédation qui détermine la disponibilité de la ressource. Par opposition, la régulation "Bottom up", ou régulation ascendante, pour laquelle c'est la ressource basale (producteurs primaire) qui contrôle la densité des populations de niveaux trophiques supérieurs. Ainsi, dans un écosystème où la ressource basale est abondante et diversifiée, la biodiversité est plus importante (Scherbert, 2008) et les interactions interspécifiques (prédation, compétition...) sont plus nombreuses. Cette complexification du réseau trophique permet d'augmenter sa stabilité (May, 1976), c'est-à-dire que les populations sont naturellement régulées. Dans ce stage, nous nous proposons de tester l'ajout d'une plante de couverture (nouvelle ressource basale) sur les communautés d'herbivores de la bananeraie. L'hypothèse de la régulation

"Bottom-up" des herbivores par la ressource basale devrait avoir un impact sur la biodiversité et l'organisation général du réseau trophique.

Les interactions trophiques ont une place importante dans la compréhension du fonctionnement des écosystèmes (Duffy et al. 2007). La caractérisation du régime alimentaire des espèces animales présentes permet d'étudier ces interactions trophiques. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer la composition des régimes alimentaires:

- L'observation directe du comportement alimentaire en milieu naturel. Cependant cette méthode présente de nombreuses limites qui la rendent souvent difficile à appliquer: l'activité nocturne des prédateurs par exemple, ou encore la diversité des sources d'alimentation non séparées spatialement. Cette méthode peut être transposée au laboratoire par des expériences de manipulation du comportement. Le sujet d'étude, espèce dont on veut connaître le régime alimentaire, est confronté à différentes sources d'alimentation en situation de "choix/non choix" est observé pour chaque source.

- L'étude des contenus stomacaux. Ces études consistent à mettre en évidence la présence et l'identité des espèces ingérées, à partir des fèces ou des contenus stomacaux. Pour les herbivores, l'examen de fragments de cuticules végétales dans des échantillons fécaux est une technique qui a largement été employé (Holechek et al. 1982).

- Les analyses isotopiques. La mesure de la signature isotopique en carbone ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) et en azote ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$) d'une espèce donnée renseigne respectivement sur l'origine du carbone consommé et sur sa position le long d'une chaîne trophique (Ponsard et Ardit, 2000). Par exemple, la signature isotopique (carbone) des herbivores, comparée à celle des végétaux permet de caractériser leur régime alimentaire.

- L'approche code barre ADN. Le code barre ADN est une méthode taxinomique relativement récente qui utilise un court fragment d'ADN standardisé comme marqueur génétique permettant l'identification d'espèces (Herbert et al., 2005). Cette méthode utilise les techniques de biologie moléculaire basées sur la recherche de séquences d'ADN spécifiques ou code barre ADN. Cette méthode fournit une identification rapide, précise et automatisée des espèces. Initialement développée pour l'identification taxinomique des espèces, cette méthode est utilisée en entomologie médicale dans la recherche de pathogènes pour la surveillance sanitaire des importations de produits alimentaires, et plus récemment, pour l'étude des régimes alimentaires. Une région intronique de 40 paires de bases (pb) du gène chloroplastique *trnL*, codant pour un ARN de transfert de la leucine (UAA), a été utilisée

comme marqueur pour des études en évolution, reconstructions phylogénétiques sur des espèces proches, identification de différents genres de plantes et pour le développement de marqueurs génétiques (Fangan et al., 1994; Gielly & Taberlet, 1994, Taberlet 2006). Dans ce stage, ce fragment de 40 pb a été utilisé comme marqueur moléculaire (code barre ADN) pour l'identification des espèces végétales présentes dans les contenus stomacaux des herbivores.

II. OBJECTIFS

Ce stage s'intègre dans un projet de thèse (Grégory Mollot, CIRAD Martinique) intitulé "Régulation biologique des bioagresseurs dans le réseau trophique des bananeraies", et financé par le CIRAD. Ce projet de thèses vise visant à comprendre les processus de régulation impliqués dans le contrôle des organismes phytophages nuisibles aux productions agricoles. Le modèle d'étude est le charançon du bananier, *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera, Curculionidae), ravageur majeur du bananier dans la plupart des régions de production, notamment en Martinique. La stratégie générale adoptée consiste à tester l'effet de l'ajout d'une plante de couverture, *Brachiaria decumbens*, sur le réseau trophique de la bananeraie. Les plantes de couvertures sont utilisées dans les bananeraies afin de limiter l'érosion du sol, le lessivage des produits phytosanitaires et l'utilisation d'herbicide. Peu d'études ont été réalisées sur les effets potentiels de l'enherbement vis-à-vis de la macrofaune dans les bananeraies. L'objectif de cette étude est de mieux comprendre les effets de l'ajout d'une plante de couverture sur les communautés de la macro faune du sol (effet de type "bottom up"). Il s'agit de déterminer les interactions trophiques entre les organismes phytophages présents dans les bananeraies, et de mettre en évidence l'influence de la ressource basale (producteurs primaires) sur l'organisation du réseau trophique.

Cette étude est axée autour de deux hypothèses de travail. Premièrement, la manipulation des ressources basales a un impact sur la structure des niveaux trophiques supérieurs (organismes phytophages). Dans ce cas une augmentation de la biodiversité et un changement de régime alimentaire des organismes phytophages sont attendus dans une bananeraie enherbée par *B. decumbens*, comparé à une bananeraie sur sol nu. La seconde hypothèse est qu'il existe une compétition interspécifique pour la ressource disponible. Dans

ce cas, l'objectif est de montrer que différentes espèces ont un régime alimentaire proche c'est-à-dire qu'elles consomment la ou les mêmes ressources

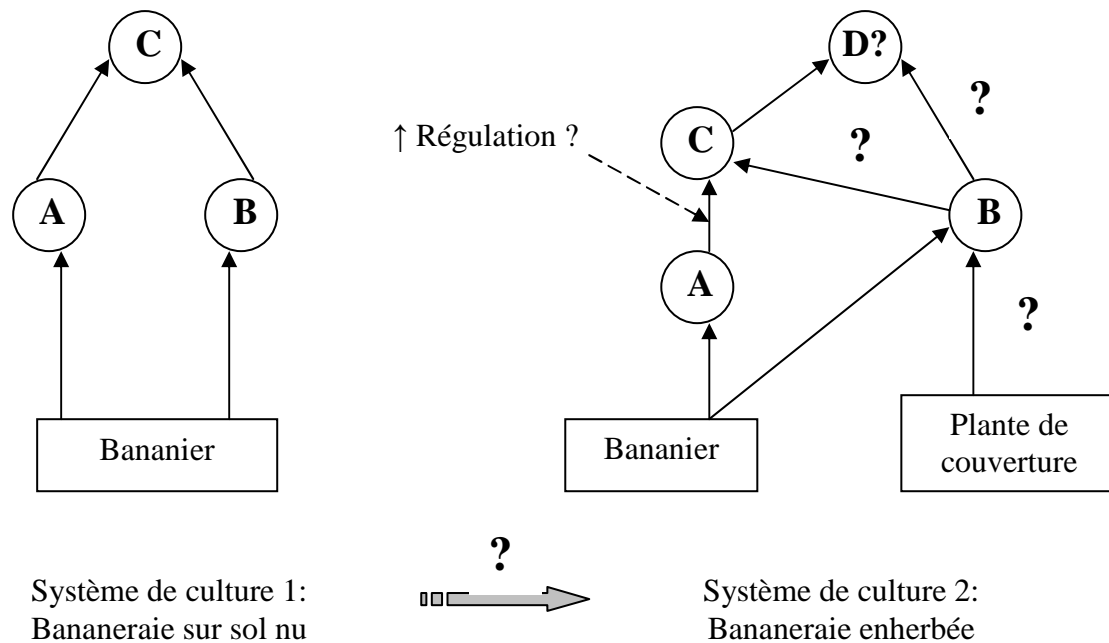


Figure 1: Effets possibles de l'ajout d'une plante de couverture sur la structure du réseau trophique et la régulation potentielle des bioagresseurs.

A, B, C et D sont des éléments de la macrofaune, A représentant un bioagresseur. Les flèches simples en traits pleins représentent les liens trophiques entre les différents éléments du réseau: à la base de la flèche se trouve l'organisme consommée par celui qui est à l'extrémité de cette flèche. (Duyck et al, 2009).

III. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique

1.1. Site expérimental

La parcelle expérimentale du CIRAD est située sur le site de Rivère Lezarde (60° 59' 59" W; 14° 39' 45" N) (**Annexe 1(A)**). Elle est constituée d'un bloc "sol Nu" (sol N) et d'un bloc "sol enherbé"(sol E). Le sol N est composé de deux rangées de bananiers et d'une inter-rangée. Le sol E regroupe quatre rangées de bananiers et les trois inter-rangées. Les deux blocks sont séparés par une rangée de bananier sur sol enherbé, cette séparation est exclue de l'expérimentation. Le bloc nu a été désherbé régulièrement avec du glyphosate. La végétation présente sur le sol enherbé se compose majoritairement de *Brachiaria decumbens* (Poaceae).

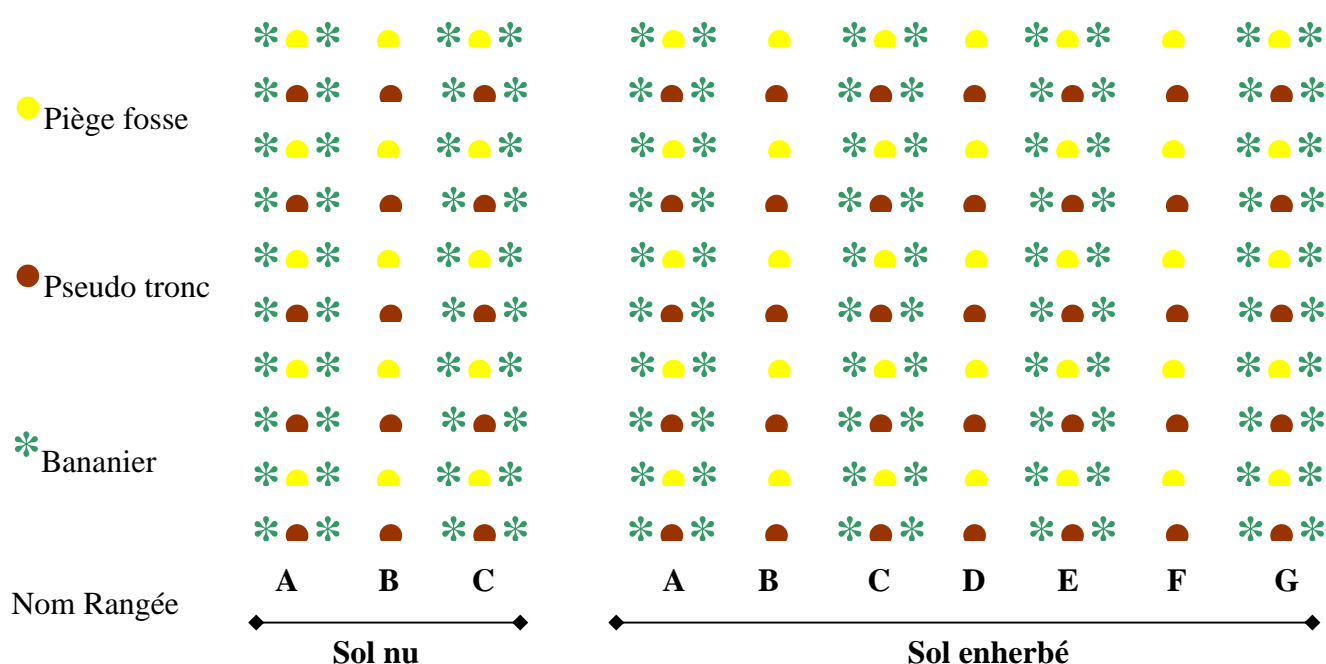


Figure 2: Schématisation du dispositif de piégeage sur la parcelle expérimentale.

1.2. Échantillonnage et identification

1.2.1. Flore

Nous avons échantillonné la flore à l'intérieur et en bordure de la parcelle expérimentale de façon exhaustive, dans la mesure du possible (voir plan **Annexe 1(B)**).

Nous avons prélevés 5 spécimens par taxons visuellement différencié (cas d'espèces très peu abondantes sur la parcelle, représentées par un ou deux individus). Chaque espèce est au moins représentée par un spécimen. Sur chaque spécimen, nous avons prélevés au moins 100mg de feuille, tissu qui contient le plus de chloroplastes (pour l'extraction de l'ADN chloroplastique).

Les premières déterminations systématiques ont été réalisées à partir des échantillons bruts et de support photos (photos prises sur le terrain). Ces déterminations ont été réalisées à l'aide d'une clé de détermination (Fournet, 2006) et de manuelles de références (Jacques Fournet et Hammerton, 1991). Par la suite, les séquences d'ADN obtenues pour ces échantillons ont été comparées et identifiées sur Genebank®.

1.2.2. Faune

Les échantillonnages ont été effectués de février à Avril 2011. Les déterminations systématiques des organismes échantillonnés ont été effectuées sous une loupe binoculaire. La reconnaissance a été faite au niveau de la famille avec une clé de détermination (Delvare et Aberlec, 1989) et avec l'aide d'un entomologiste de l'équipe, M Philippe Ryckewaert.)

Nous avons utilisés trois méthodes de piégeage:

- **Pièges de Barber** (ou piège fosse). Il s'agit d'un contenant enterré dans le sol, fermé par un couvercle (protection). Les parois sont lisses et une collerette est en plus placée au sommet du piège; les insectes qui y tombent ne peuvent plus ressortir. Le sol a été creusé et les pièges ont été disposés le long de chaque rangée et inter-rangée, à intervalle régulier sur les deux blocks à raison de 5 pièges par rangée (quatre pièges pour la dernière rangée sol E, plus petite). Dans certains pièges, des capsules de la phéromone d'aggrégation (Cosmolure®, Costa Rica), la sordidine, sont ajoutées afin d'augmenter quantitativement la capture de charançons. (Ce biais dans l'abondance des charançons explique pourquoi leur abondance n'a pas été mesurée).

- **"Pseudo tronc"**. Des sections de pseudo tronc, cinq par rangée, ont été placées dans toutes les rangées de bananiers, sur les deux sols, entre les pièges "fosse". Ils ont été changés régulièrement lorsqu'ils étaient desséchés; soit environ tous les quinze jours.

- **Aspirateur**. Pour l'épifaune et les organismes volants sur les deux sols. Afin de limiter la dégradation de l'ADN, chaque individu capturé a été placé dans un tube rempli d'alcool (70°), et directement disposé dans une glacière réfrigérée sur le terrain, avant d'être stocké au congélateur (- 20°C) au laboratoire.

1.3. Extraction ADN

1.3.1. Échantillons végétaux

Parmi les échantillons récoltés, quatre individus par espèces (quatre répétitions) sont utilisés pour les extractions d'ADN (le dernier est conservé au laboratoire), à l'exception des espèces faiblement représentées sur le site d'échantillonnage pour lesquelles nous avons extrait l'ADN des individus disponibles. Ces extraits d'ADN ont permis de constituer une librairie de référence du gène trnL pour toutes les espèces végétales présentes à l'intérieur et en bordure de la parcelle expérimentale. Les échantillons ont été séchés pendant 48H dans un lyophilisateur puis réduit en poudre avec deux billes en métal d'un diamètre de 5mm placées dans le tube, et vortexés pendant une dizaine de secondes. Pour limiter les contaminations croisées, les billes sont nettoyées avec une solution qui dégrade les acides nucléiques (DNA Away ®). La poudre est conservée dans un nouveau tube stérile au réfrigérateur 24H avant l'extraction d'ADN.

L'ADN total a été extrait à partir de 20mg de poudre avec le kit d'extraction "DNeasy Mini Plant Kit" (Qiagen®, Venlo, Pays-Bas), en suivant le protocole standard recommandé. Chaque échantillon d'ADN extrait est conservé dans 100µL de tampon d'élution.

1.3.2. Contenus stomacaux

➤ Dissection

Les échantillons prélevés ont été disséqués afin de récupérer l'appareil digestif, à l'exception des espèces de taille inférieure à 5mm environ (*Cicadellidae sp.*, *Cydnidae sp.*). Pour ces deux espèces la dissection s'est limitée à l'ablation des pattes, des ailes et de la tête afin de réduire le matériel biologique autre que l'appareil digestif. Quant aux autres individus, l'appareil digestif (tube digestif et/ou l'estomac en fonction des différentes espèces) a été prélevé à l'aide de pinces et de scalpels, sous une loupe binoculaire. Pour *C. sordidus*, *Polytus sp.* et *Tenebrionidae sp.* la simple dissociation de la tête du thorax a permis de prélever la poche stomacale (*C. sordidus*, *Polytus sp.*) et au tube digestif (*Tenebrionidae sp.*). Pour les *Grillidae sp.* (grillons), *Blattidae sp.* (blattes), *Chrysomelidae sp.* (Chrysomèles) et *Rhinocricidae sp.* (iules) l'appareil digestif (entier ou en partie) a été prélevé par dissection

complète. Chaque contenu stomacal a été placé individuellement dans un tube stérile contenant dans du tampon de lyse (Tampon AP1 du kit d'extraction) et conservé au congélateur (- 20°C).

Remarque: Tout le matériel biologique restant par échantillon disséqué (pattes, exosquelette, tête...) a été conservés dans un tube stérile rempli d'alcool (70°) et conservé pour les analyses isotopiques.

➤ Extraction

L'ADN total a été extrait des contenus stomacaux issus des dissections, en utilisant le kit d'extraction "DNeasy Plant Mini kit" et en suivant le protocole fourni par le fabricant (Qiagen®). La totalité du matériel biologique stomacal pour un échantillon disséqué a été utilisé pour l'extraction. En raison de l'état de dégradation supposé de l'ADN végétale présent dans les contenus stomacaux due aux enzymes digestives, la dernière étape du protocole standard a été modifiée. La quantité d'ADN final a été élue dans 50 µL de tampon au lieu de 200 µL afin d'augmenter sa concentration.

L'ensemble des échantillons soumis à l'extraction ADN végétal dans les contenus stomacaux est présenté dans le **tableau 2**.

Tableau 1: Total des échantillons soumis à l'extraction ADN.

Taxon	SOL N	SOL E	Total
<i>Rhinocricidae sp.</i>	56	56	112
<i>Tenebrionidae sp.</i>	17	28	45
<i>Polytus sp.</i>	14	55	69
<i>Cosmopolites sordidus</i>	11	62	73
<i>Chrysomélidae sp.</i>	0	50	50
<i>Blattidae sp.</i>	4	6	10
<i>Pentatomidae sp/ Cydnidae sp.</i>	1	16	17
<i>Grillus assimilis</i>	0	9	9
<i>Cicadidae sp</i>	0	18	18
Total	103	300	403

2. Analyses isotopiques

2.1. Principe

Les atomes de carbone, azote, oxygène, soufre... présentent des formes isotopiques stables qui ont les mêmes propriétés chimiques mais des vitesses de réaction et équilibres d'états différents. L'étude des rapports de concentration des différents isotopes d'un même

élément donne accès à des connaissances sur le fonctionnement des réseaux trophiques. L'analyse des isotopes stables de l'azote et du carbone est une méthode qui permet d'estimer la position trophique et les flux de carbone d'une espèce dans un réseau trophique (Ponsard et Ardit, 2000, Ecology). Les espèces biologiques contiennent différents ratio des isotopes de l'azote ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) et du carbone ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$). Les tissus qui les composent sont formés à partir des atomes présents dans leur nourriture, et reflètent la composition isotopique de ce qu'ils ont assimilés. Les tissus biologiques des espèces ont tendance à être légèrement enrichis par l'isotope le plus lourd par rapport aux tissus des espèces de niveau trophique inférieur. Ces propriétés permettent de suivre les flux de carbone et d'azote au sein du réseau et sont utilisées comme indicateur de niveau trophique (Ponsard and Ardit 2000). Le ratio de deux isotopes stables d'un élément X est exprimé par la différence de ratios, en part par millier, depuis un standard. L'unité de mesure est le δ calculé comme suit:

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\left(\frac{^{13}\text{C}_{\text{éch}}/^{12}\text{C}_{\text{éch}}}{^{13}\text{C}_{\text{standard}}/^{12}\text{C}_{\text{Std}}} - 1 \right) \times 1000 \right)$$

Le carbone des végétaux porte une signature isotopique selon leur type de métabolisme et leur milieu. On distingue deux voies métaboliques d'assimilation du CO_2 atmosphérique par les végétaux: les voies métaboliques en C3 et en C4 qui provoquent un fractionnement isotopique différent du carbone au cours de l'assimilation de CO_2 atmosphérique. Les plantes à métabolisme photosynthétique de type C3 possèdent une déviation $\delta^{13}\text{C}$ de l'ordre de -30‰ en moyenne en zone tropicale, les herbes possédant en général une déviation de $\delta^{13}\text{C}$ plus faible que les arbres. Pour les plantes en C4, cette valeur de $\delta^{13}\text{C}$ se situe entre -13‰ et -14‰ (Medina et al., 1999; Remaud et Akota, 2004; Staddon, 2004).

Les signatures isotopiques des producteurs primaires à la base de la chaîne trophique se transmettent jusqu'au prédateur final avec un enrichissement de l'ordre de 0.4‰ pour le carbone, de 3 à 4‰ pour l'azote à chaque niveau trophique (Minagawa et Wada, 1984). Les valeurs en $\delta^{13}\text{C}$, largement conservées, fournissent des informations sur l'identité du producteur primaire à la base d'une chaîne alimentaire. Le bananier, seule plante en C4 de la bananeraie, a une déviation de $\delta^{13}\text{C}$ de l'ordre de -26.5‰ (Yakir et Israeli, 1995). Il est *a priori* possible de déterminer l'identité du producteur primaire entre *Musa* spp (bananier) et la plante de couverture *Brachiaria decumbens* (métabolisme C3), et par conséquent d'identifier

la ressource basale d'une chaîne/d'un réseau trophique. Plusieurs sources de production primaire peuvent être à l'origine d'un réseau trophique. La signature du carbone d'un organisme du réseau permet d'estimer la part des différentes sources dans son alimentation.

L'enrichissement trophique isotopique ΔN est la différence entre le $\delta^{15}N$ d'un organisme et celui de sa nourriture. L'enrichissement trophique vaut en moyenne $3.4 \pm 1.1\text{‰}$ (Minagawa et Wada, 1984). La signature de l'azote d'un organisme permet de positionner le niveau trophique de cet organisme le long d'une chaîne trophique et d'estimer la longueur de cette chaîne lorsque l'on dispose de la signature des producteurs primaires. (Vander Zanden et Rasmussen, 1999; Ponsard et Ardit 2000)

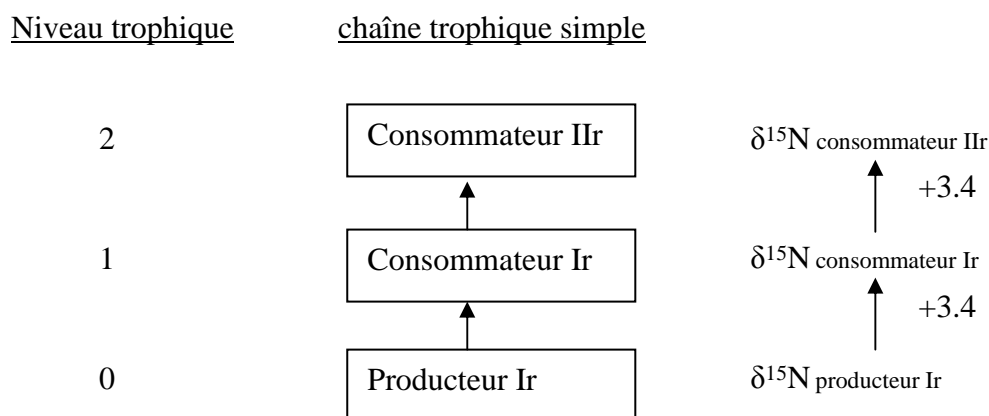


Figure 3: Détermination du niveau trophique par $\delta^{15}N$

Dans cette étude, les analyses en isotopes stable du carbone et de l'azote des espèces phytophages vont permettre de déterminer quelle est leur principale source d'alimentation sur sol nu et sol enherbé.

2.2. Conditionnement des échantillons

Les échantillons ont été lyophilisés pendant 48H puis réduit en poudre mécaniquement à l'aide d'un mortier et d'un pilon (Nelson et al., 1998; Schmidt et al., 2004). Pour chaque échantillon, 0,40 mg ($\pm 0,02\text{mg}$) ont été placés dans une capsule d'étain standard de 4 x 3.2mm. Ces capsules ont été envoyées pour être analysées par Spectrométrie de Masse des Rapport Isotopiques (SMRI) au laboratoire d'analyse (Scottish Crop Institute; Dundee, Ecosse). Les valeurs de $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ sont données par ce laboratoire et sont calculées comme suit:

- $\delta^{13}\text{C} = 1000 * (R_{\text{éch}} - 0.0112372) / 0.0112372$ (exprimé en ‰)

- $\delta^{15}\text{N} = 1000 * (R_{\text{éch}} - 0.0036765) / 0.0036765$ (exprimé en ‰)

$R_{\text{éch}}$: rapport isotopique de l'échantillon à mesurer, 0.0112372 est la valeur de référence pour le ^{13}C et 0.0036765 est la valeur de référence pour le ^{15}N

Remarque: tous les échantillons (taxons échantillonnés) ont été soumis à cette analyse à l'exception de *C. sordidus* issu du sol enherbé (restes non conservés après dissection) et des *Cicadellidae* sp. (masse totale de matière sèche inférieure à 0.40mg).

Tableau 2: Echantillons soumis aux analyses par SMRI.

Taxon	SOL N	SOL E
<i>Rhinocricidae</i> sp.	20	20
<i>Tenebrionidae</i> sp.	16	20
<i>Polytus</i> sp.	14	20
<i>Cosmopolites sordidus</i>	11	-
<i>Chrysomélidae</i> sp.	0	20
<i>Blattidae</i> sp.	4	6
<i>Pentatomidae</i> sp/		
<i>Cydnidae</i> sp.	0	16
<i>Grillus assimilis</i>	0	9
<i>Cicadellidae</i> sp	0	18

3. Marqueurs moléculaires

3.1. Amplification par PCR

Dans cette étude, la région intronique du *trnL* (UAA) a été utilisée comme code barre pour l'amplification PCR et l'identification des espèces

3.1.1. Mise au point du protocole expérimental.

➤ Choix des amorces.

Deux couples d'amorces déjà disponibles au laboratoire ont été testés (**tableau 3**). Les amorces *c* et *d* (Taberlet et al. 1991) s'hybrident sur des parties exoniques du gène *trnL*. Ce couple amplifie un fragment de long de 456 pb qui encadre la totalité de l'intron *trnL* (UAA) et quelques paires de bases de chaque côté appartenant à la partie codante du gène *trnL* (UAA). Les amorces *g* et *h* (Taberlet et al. 2007) représentant deux régions hautement

conservés qui amplifient la "P6 Loop" ou "petit fragment" de 40 pb. Le fragment *g,h* est contenu à l'intérieur du grand fragment *c,d*(**figure 3 et 4**).

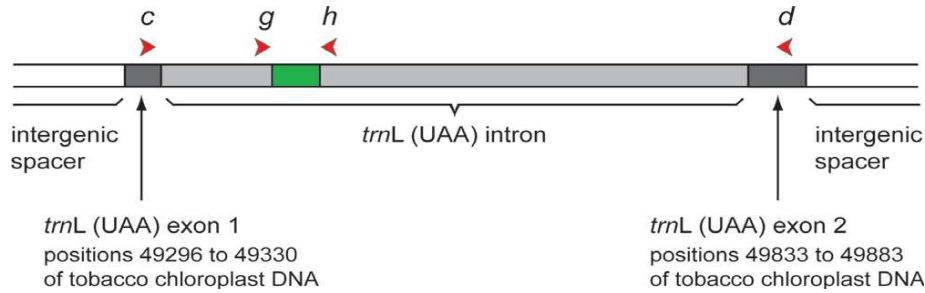


Figure 4: Position des amorces c, d, g et h sur le gène chloroplastique TrnL (UAA).
La P6 Loop amplifiée par les amorces g et h est indiquée en vert

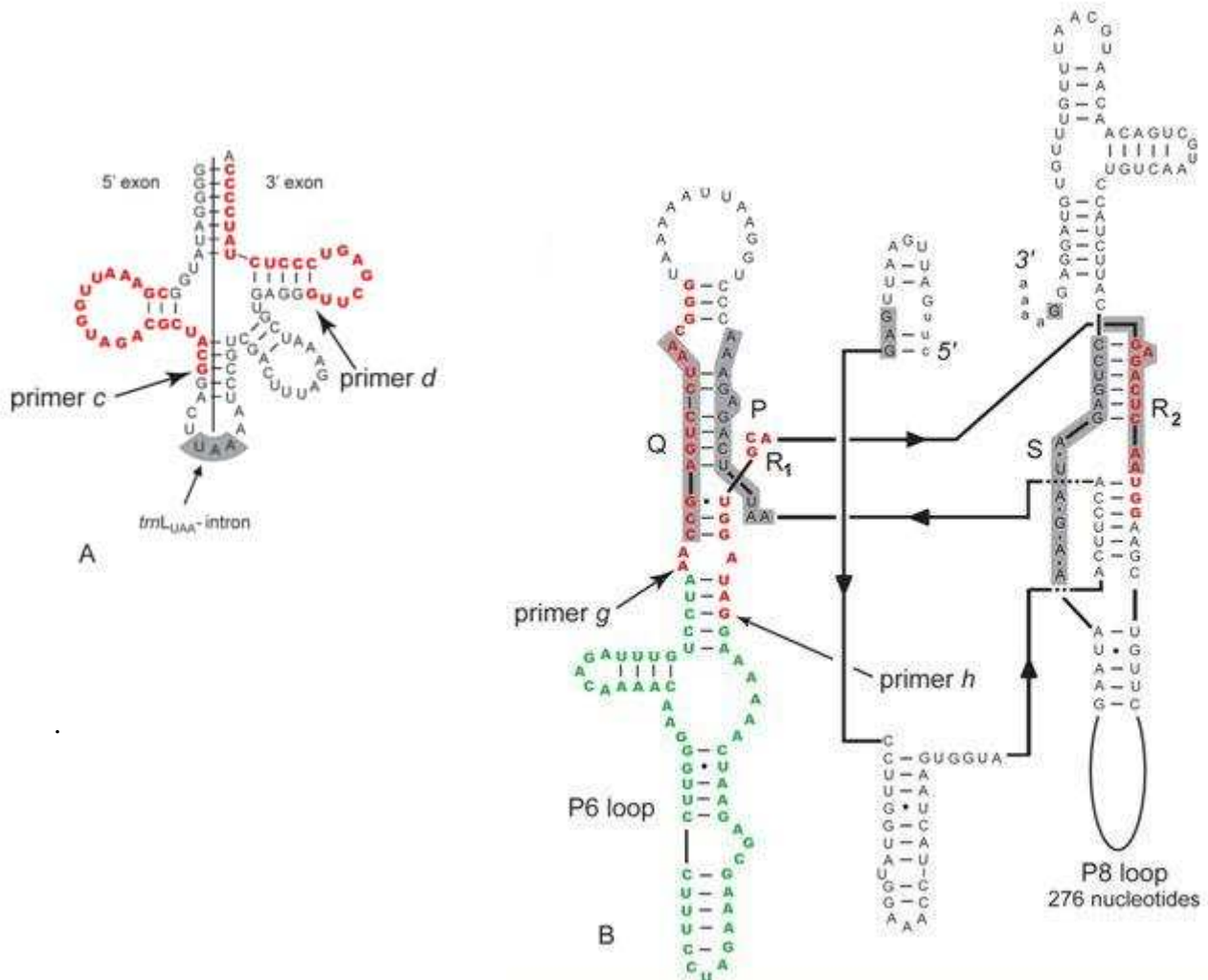


Figure 5: Position des amorces c et d sur la structure secondaire de l'exon *trnL* (UAA) (A) et des amorces g et h sur la structure secondaire de l'intron *trnL*. (Référence pour *Nymphaea odorata*). Les éléments hautement conservés (P, Q, R1, R2 et S appartenant à la région catalytique) sont encadré en gris. La P6 Loop, amplifiée par g et h est notée en lettres vertes. Le début et la fin des sites d'hybridation des quatre amorces sont indiqués par une flèche et leur position est identifiée par des lettres rouges. (Taberlet et al., 2007)

Tableau 3: Séquences des couples d'amorces universelles amplifiant l'intron TrnL (UAA)

Amorce	Code	Séquence 5' - 3'
<i>c</i>	A49325	CGAAATCGGTAGACGCTACG
<i>d</i>	B49863	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
<i>g</i>	A49425	GGGCAATCCTGAGCCAA
<i>h</i>	B49466	CCATTGAGTCTCTGCACCTATC

Pour la réalisation de la librairie de référence *trnL*, ces deux couples d'amorces ont été testés séparément sur des extraits d'ADN de *Musa spp.* et de *Brachiaria decumbens* (plante de couverture) afin de retenir celui qui amplifie le mieux la séquence d'intérêt (code barre *trnL*). Ces amorces ont aussi été testés avec différents programmes PCR: "TrnL 1" (Taberlet et al., 2007) et des programmes mis en place pour ce test: TrnL 2, TrnL3 (voir "3.1.1 Mise au point du protocole - Choix du Programme PCR").

Pour l'amplification de l'ADN végétal présent dans les contenus stomacaux, le fragment *trnL* a été amplifié avec les amorces *g,h*, soit le petit fragment "P6 Loop". Ce choix est justifié par la technique de séquençage utilisé par la suite: le séquençage 454 de Roche®, qui peut s'appliquer à des fragments d'une taille maximale de 300 pb à 400 pb environ (le couple *c,d* amplifiant un fragment de 456 pb n'a pas été utilisé). Elle est aussi justifiée par le fait que les enzymes contenues dans le tractus digestif dégradent les acides nucléiques: les probabilités d'amplifier un fragment de 40pb sont plus élevées que pour un fragment de 456pb. Ces amorces ont été "tagguées" (également pour le pyroséquençage); elles possèdent 7 nucléotides en 5' de chaque amorce (sens et antisens), ajoutés lors de leur synthèse. Le programme PCR initialement testé est celui qui a été choisi pour amplifier les séquences végétales de la librairie. Par la suite un autre programme "GH59" a été testé afin d'améliorer l'efficacité de l'amplification.

➤ Choix du programme PCR

Toutes les amplifications d'ADN ont été réalisées dans un volume totale de 20µL contenant 10µL de Master Mix (Qiagen®) (composé de Taq Polymerase "HotStarTaq *Plus*", d'un tampon PCR (avec 3 mM Mg CL₂), et 400 µM de chaque dNTP), 1µL de chaque amorce et 8µL d'extrait d'ADN, par un "Thermocycleur T.Gradient" (BIOMETRA®).

Tous les programmes PCR commencent par une phase d'activation de la Taq Polymérase de 5min à 95°C, suivi par:

Trnl1: 35 cycles d'amplifications; un cycle étant défini comme suit: 30s à 95°C, 30s à 50°C et 2min à 72°C.

Trnl2 : 35 cycles d'amplifications; un cycle étant défini comme suit: 30s à 95°, 1min à 95°C et 45s à 75°C. L'amplification se termine par une phase d'élongation finale de 1min à 72°C.

Trnl3 : 35 cycles d'amplifications en deux étapes successives: premièrement 5 cycles; un cycle étant défini comme suit: 30s à 95°, 30s à 50°C et 2min à 70°C. Puis 30 cycles; un cycle étant comme suit: 30s à 95°C, 30S à 55°C et 2min à 72°C.

Trnl4 : 35 cycles d'amplifications en deux étapes successives: premièrement 5 cycles; un cycle étant défini comme suit: 30s à 95°, 30s à 55°C et 2min à 70°C. Puis 30 cycles; un cycle étant comme suit: 30s à 95°C, 30s à 60°C et 2min à 72°C.

GH59: 35 cycles; un cycle étant défini successivement par une étape de 30 secondes à 95°C, 30s à 59°C et 2min à 72°C.

3.1.2 Amorces spécifiques

L'objectif de cette expérience est d'utiliser des amorces spécifiques de chaque espèce qui amplifient des fragments de taille différentes. La différence de longueur entre le fragment amplifié chez *Musa spp.* et le fragment amplifié chez *Brachiaria decumbens* permet de discriminer ces deux espèces lors la migration par électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR. Quatre couples d'amorces spécifiques ont été spécialement créées au cours de cette étude (**Annexe 4**) pour *Musa spp.* et *Brachiaria decumbens*, les deux espèces principales présentent dans la parcelle. Les séquences de ces amorces ont été mises au point avec le logiciel "Primer 3® version 0.4.0." (Steve Lincoln, Mark Daly, et Eric S. Lander) puis synthétisées par le laboratoire Eurogenetec. L'hybridation de ces amorces entre elles a été testées a l'aide du logiciel Geneious® v5.3 (Drummond AJ. *et al.*, 2010) afin de choisir les couples les plus spécifiques. Le but est d'amplifier par PCR multiplex les deux fragments au cours de la même amplification, s'ils sont présents, dans un même extrait d'ADN. Les migrations sur gel des produits PCR permettront d'identifier les séquences de *Musa spp.* et *Brachiaria decumbens* présentes dans les extraits ADN issus des contenus stomacaux.

Les PCR ont été réalisées dans un volume total de 25 µL contenant 12.5µL de Master Mix, 1.25µL de chaque amorce (deux couples d'amorces) et 9.75µL d'extrait d'ADN stomacal. Le programme PCR comporte une première phase d'activation de la Taq Polymérase (5 min à 95°C), suivi de 35 cycles d'amplification en deux étapes: 5 cycles de 30s

à 95°C, 30s à 55°C et 2 min à 72°C puis 30 cycles de 30s à 95°C, 30s à 59°C et 2 min à 72°C. Les produits PCR migrent sur un gel à 2%, (90ml de TAE à 1%, 1,8mg d'agarose) pendant 30 minutes sous un courant de 100V. Pour la révélation de l'ADN, les gels sont plongés dans un bain de BEt pendant 45 minutes puis rincés à l'eau pendant 1 minute avant d'être placé sous lumière UV pour visualiser la révélation de l'ADN.

3.2. Code barre ADN et séquençage 454

3.2.1. Constitution librairie

Le séquençage des produits PCR issu de l'amplification des extraits ADN des plantes a été réalisé par le laboratoire Macrogen (Séoul, Corée du sud) en utilisant la méthode de Sanger (**Annexe 5 (A)**). Les séquences brutes obtenues ont été traitées à l'aide du logiciel Geneious® version 5.3.6. Les séquences de mauvaise qualité (% de bases de bonne qualité < 70%) ont été retirées. La librairie trnL répertorie les séquences consensus issus de l'alignement des séquences brutes calculé par le logiciel sur la base de leur degré de similarité.

La librairie obtenue à partir de l'amplification du gène trnL par les amorces *c,d* a été modifiée avec le logiciel Geneious®. La séquence finale conservée pour chaque individu représente le fragment de la P6 Loop, amplifié par le couple d'amorce *g,h*. Les séquences de la librairie représentent ainsi le même fragment (partie du gène, taille du fragment) qui sera amplifié et séquençé à partir de l'ADN des contenus stomacaux. Le BLAST de ces séquences issu de l'ADN des contenus stomacaux sur les séquences de la librairie sera plus précis.

3.2.2. Contenus stomacaux

La technique retenue pour le séquençage des fragments ADN amplifiés à partir des contenus stomacaux est le séquençage 454 de Roche®. Le principe de cette technique (basé sur la méthode du pyroséquençage) consiste à lier une amorce à l'ADN cible de taille inférieure à 400 pb, puis à ajouter séquentiellement et dans l'ordre une base à partir de l'extrémité de l'amorce (Shapiro, 2008). La séquence est ainsi déduite en fonction de l'ordre d'incorporation des nucléotides sur l'ADN complémentaire de la cible néo synthétisée (**Annexe 5 (B)**).

4. Analyses statistiques

4.1. Analyses isotopiques

Les analyses statistiques des données isotopiques ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team, 2008). Le traitement est le type de sol "sol nu"/"sol enherbé", et les variables sont les rapports isotopiques du carbone et les rapports isotopiques de l'azote. L'influence du traitement sur les valeurs des rapports isotopiques a été testée par ANOVA sur les espèces suivantes: *Polytus sp*, *Rhinocricidae sp*, *Tenebrionidae sp*. et *Blattidae sp*.

Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ présentées pour les espèces végétales sont:

- *Musa spp.*, bananier (plante en C3): $\delta^{13}\text{C} = -26.5\%$ (Yakir et Israeli, 1995)
- *Brachiaria decumbens* (plante en C4): $\delta^{13}\text{C} = -12.1\%$ (Medina *et al.*, 1999)
- *Cynodon dactylon* (plante en C4) : $\delta^{13}\text{C} = 13.6 \pm 0.1 \%$ (Mollot *et al.*, 2010, soumis)

Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ pour le bananier (*Musa spp.*), *B. decumbens* et *C. dactylon* sont respectivement $4.1 \pm 0.2\%$, $2.1 \pm 0.5\%$, et 2.1 ± 0.3 (Mollot *et al.*, 2011, soumis).

L'origine du carbone pour chaque taxon a été analysée par le logiciel IsoSource version 1.3 (Phillips *et al.*, 2003). Ce logiciel permet de déterminer la distribution statistique de la proportion d'une source de carbone dans la valeur total du $\delta^{13}\text{C}$ d'un organisme. Les sources que nous avons retenues pour les calculs de distribution sont le bananier et les deux plantes (de couverture) majoritaires: *B. decumbens* et *C. dactylon*. Tous les taxons ont été analysés, pour les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ sur sol N et sur sol E.

4.2. PCR

Les résultats issus des PCR sur les contenus stomacaux seront testés par GLM (études ultérieures).

4.3. Code barre ADN

Les données obtenues (séquences de la "P6 Loop") seront traitées à l'aide du logiciel SESAME ("SEquence Sorter & AMplicon Explorer"; Megléczet *al.* 2010). Ce logiciel permet d'automatiser les étapes de traitement bioinformatique des centaines de milliers de séquences obtenues à l'issu du séquençage 454.

V. RESULTATS

1. Échantillonnages

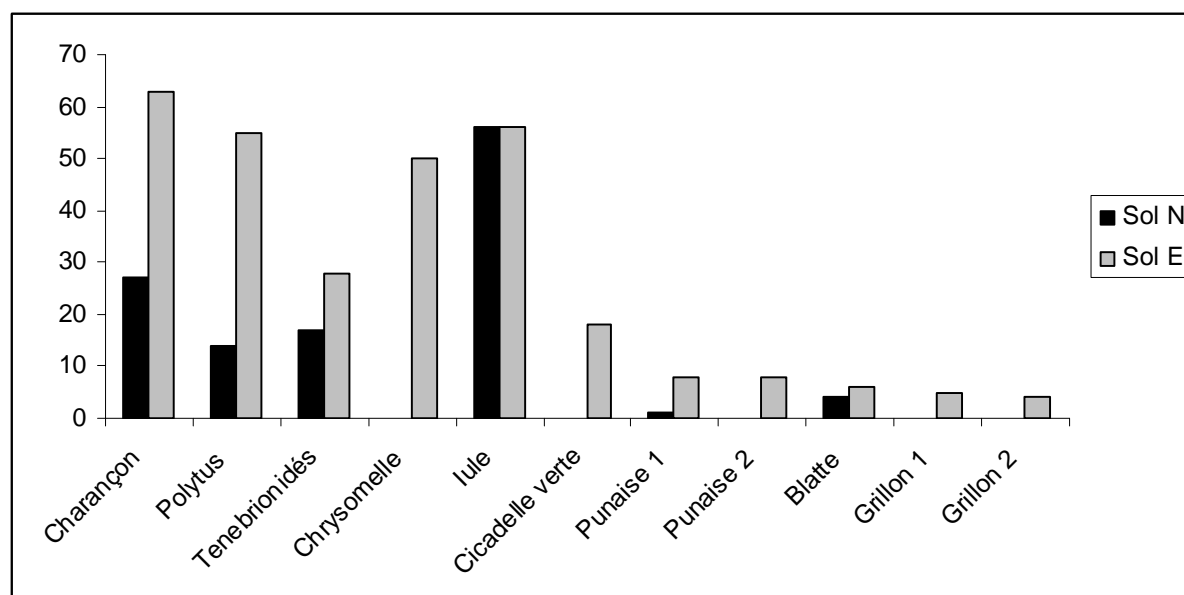
1.1. Faune

Tableau 4: Diversité des taxons et nombre d'échantillon prélevé sur les deux sols.

Taxon	Classe	Ordre	Famille	Genre et/ou espèce	Nbr. Individus piégés		Nbr. Individus piégés total
					sol N	Sol E	
Iule	Diplopoda	Spirobolida	Rhinocricidae	<i>Rhinocricidae sp.</i>	56	56	112
Blatte	Hexapoda	Blatoptera	Blattidae	<i>Periplaneta americana</i>	4	6	10
Chrysomèle	Hexapoda	Coleoptera	Chrysomelidae	<i>Chrysomelidae sp.</i>	0	50	50
Charançon	Hexapoda	Coleoptera	Curculionidae	<i>Cosmopolites sordidus</i>	27	63	90
Polytus	Hexapoda	Coleoptera	Curculionidae	<i>Polytus sp.</i>	14	55	69
Ténébrionidé	Hexapoda	Coleoptera	Tenebrionoidea	<i>Tenebrionidae sp.</i>	17	28	45
Cicadelle verte	Hexapoda	Hemiptera	Cicadellidae	<i>Empoasca vitis</i>	0	18	18
Punaise 1	Hexapoda	Heteroptera	Cydnidae	<i>Cydnidae sp.</i>	0	8	8
Punaise 2	Hexapoda	Heteroptera	Pentatomidae	<i>Pentatomidae sp.</i>	1	8	9
Grillon	Hexapoda	Orthoptera	Grillonidae	<i>Grillus assimilis</i>	0	9	9
Total					119	301	420

Tous les taxons échantillonnés sont illustrés en **annexe 3(B)**.

Figure 6: Diversité et des abondances des taxons échantillonnés sur les deux sols.



Les résultats montrent un changement dans la diversité des espèces présentes. Sur sol enherbé 11 taxons sont représentés, contre 6 sur sol nu. *Cicadellidae sp.*, *Cydnidae sp.*, *Pentatomidae sp.*, *Blattidae sp.* et *Chrysomelidae sp.* sont exclusivement présentes sur sol enherbé, avec les techniques de piègages utilisées. (**Figure 5**).

L'abondance des individus au sein de chaque taxon est également affecté. Une diminution importante sur sol nu par rapport au sol enherbé est observé pour tous: diminution de 57% pour les *C. sordidus*, 74.5 % pour *Polytus sp.*, 39 % pour *Tenebrionidae sp.*, 87.5 % pour *Pentatomidae sp.* enfin 30 % pour *Blattidae sp.*.

1.2. Flore

Tableau 5: Diversité et abondance des familles de plantes présentes dans la bananeraie.

Famille	Abondance spécifique
Asteraceae	1
Cecropiaceae	1
Convolvulacea	1
Cucurbitaceae	1
Euphorbiaceae	1
Fabaceae	9
Melastomataceae	2
Musaceae	1
Poaceae	4
Polypodiaceae	1
Rubiaceae	1
Rutaceae	2
Simaroubaceae	2
Famille inconnu	1

Au total, 28 espèces différentes ont été récoltées, réparties sur 14 familles. Les plus représentées sont les fabacées (9 espèces). Cependant la plante majoritairement présente en plus du bananier est la plante de couverture *Brachiaria decumbens* (Poaceae) qui recouvre toute la parcelle enherbé. Une autre espèce est relativement bien représentée à l'intérieur de la parcelle: *Cynodon dactylon* (Poaceae). Les autres espèces sont principalement rencontrées en bordure de la bananeraie, en faible quantité. Un seul taxon "famille inconnu" n'a pas pu être déterminé, tant par l'utilisation de clé de détermination que par BLAST de sa séquence sur Genbank®. L'ensemble des espèces végétales échantillons est présenté en **annexe 2**. Les trois espèces récurrente dans cette étude (*Musa spp.*, *B. decumbens* et *C. dactylon*) sont illustrés en **annexe 3(A)**.

2. Analyses Isotopiques

Les résultats et paramètres retenus pour les analyses statistiques sont donnés dans le **tableau 6**. Pour 6 échantillons, l'analyse n'a pas pu fournir de résultats, ils ont été écartés des analyses. L'ensemble des données intégrées dans les analyses est présenté dans le **tableau 7**.

Tableau 6: Valeurs moyenne de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ (exprimé en ‰) pour les taxons retenus pour les analyses statistiques. N = sol nu, E = sol enherbé, SE= erreur standard.

Taxon	Traitement	Nbr de répétition	$\delta^{13}\text{C}$	SE 13C	$\delta^{15}\text{N}$	SE 15N
<i>Blattidae sp.</i>	N	4	-23.64	1,51	3.37	0,48
	E	6	-22.09	1,44	3.59	1,27
<i>Rhinocricidae sp.</i>	N	20	-21.27	0,40	3.85	0,39
	E	20	-18.17	0,68	2.78	0,37
<i>Polytus sp.</i>	N	10	-26.11	0,22	2.44	0,54
	E	20	-25.96	0,17	2.78	0,39
<i>Tenebrionidae sp.</i>	N	15	-25.42	0,14	3.84	0,38
	E	19	-24.99	0,13	4.49	0,47

L'analyse par ANOVA a permis de tester l'influence du traitement (sol N/ sol E) les valeurs du $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$. Les résultats sont donnés dans le **tableau 9** et illustrée par la **figure 6**.

Tableau 7: ANOVA testant l'influence du traitement "sol N/ sol E" sur les variables " $\delta^{13}\text{C}$ " et " $\delta^{15}\text{N}$ ". (au risque $\alpha=5\%$, résultat significatif *= p-value< 0.05)

Taxon	13C			15N		
	ddl	F	p-value	ddl	F	p-value
<i>Rhinocricidae sp.</i>	1.38	15.56	<0.001***	1.38	3.98	0.053* ?
<i>Tenebrionidae sp</i>	1.32	4.74	0.037*	1.32	1.07	0.308
<i>Blattidae sp</i>	1.8	0.52	0.492	1.8	0.005	0.947
<i>Polytus sp.</i>	1.28	0.25	0.623	1.28	0.26	0.612

Les résultats de l'ANOVA montrent que:

- **pour le $\delta^{13}\text{C}$** : Pour *Rhinocricidae sp.*, et *Tenebrionidae sp.*, il y a une déviation significative de la valeur du $\delta^{13}\text{C}$ entre sol le sol nu et le sol enherbé vers les valeurs plus proches de celles de *Brachiaria decumbens* et *Cynodon dactylon*. (Figure 6). Pour *Rhinocricidae sp.*, cette valeur passe de -21.27 ‰ sur sol N à -18.17 ‰ sur sol E. Concernant

Tenebrionidae sp le $\delta^{13}\text{C}$ vaut -25.42 ‰ sur sol N et passe à -24.99 ‰ sur sol E. Et pour *Blattidae sp* et *Polytus sp*, il n'ya pas de différence significative de la valeur de $\delta^{13}\text{C}$ entre les deux sols.

- **pour le $\delta^{15}\text{N}$** : Le résultat de l'ANOVA concernant le déplacement de la valeur du $\delta^{15}\text{N}$ chez *Rhinocricidae sp.* est très proche du seuil de significativité. Le $\delta^{15}\text{N}$ passe de 3.85 ‰ sur sol nu à 2.78 ‰ sur sol E, p-value = 0.0053. Ce déplacement peut être interprété *a priori*. Pour les autres espèces, aucune différence significative n'a été mise en évidence.

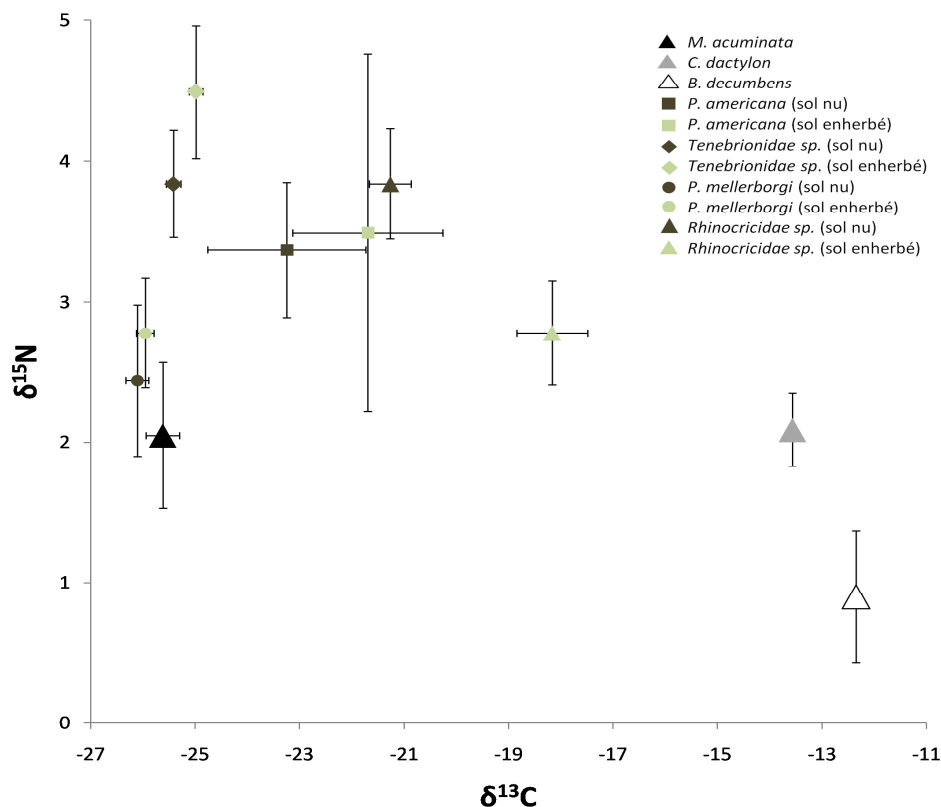


Figure 7: Variation isotopique du carbone et de l'azote sur sol nu et enherbé. Chaque taxon est positionné par rapport à sa valeur de $\delta^{13}\text{C}$ (axe des abscisses) et sa valeur de $\delta^{15}\text{N}$ (axe des ordonnées). Les valeurs pour le sol nu sont en noir et en vert pour le sol enherbé. Les valeurs de *Musa spp.*, *Brachiaria decumbens* et *Cynodon dactylon* permettent de visualiser vers quelle(s) ressource(s) les déviations de $\delta^{13}\text{C}$ sont dirigées.

Les résultats issus des analyses réalisées IsoSource sont présentés ci-après:

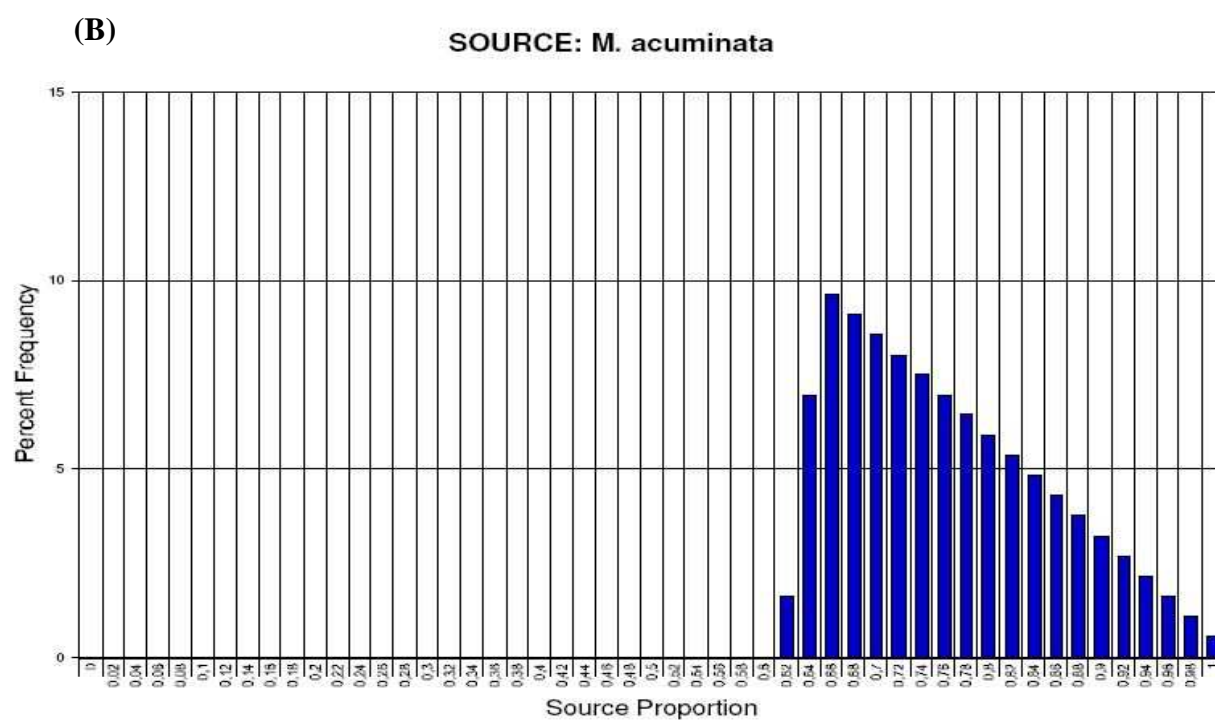
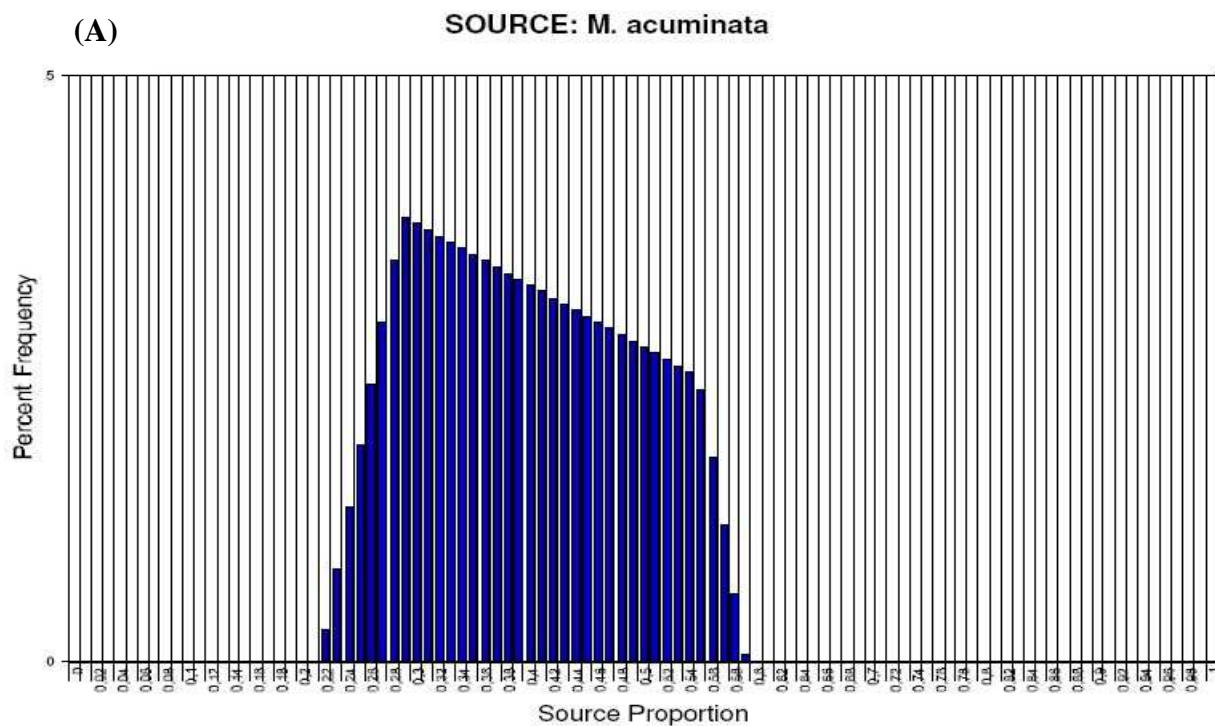


Figure 8: Proportion de la source *Musa sp.* La part de cette source de carbone dans les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ de *Rhinocricidae sp.*(A) et *Tenebrionidae sp.*(B) est graphiquement illustrés les barres bleues.

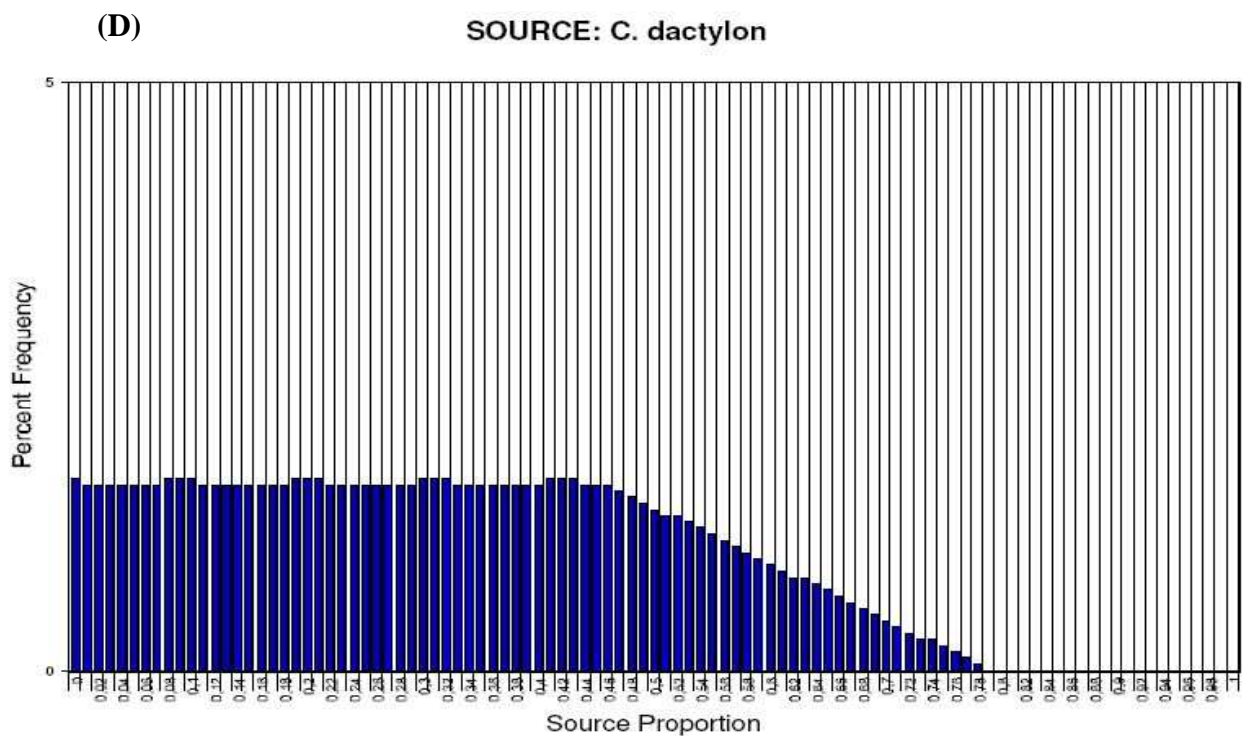
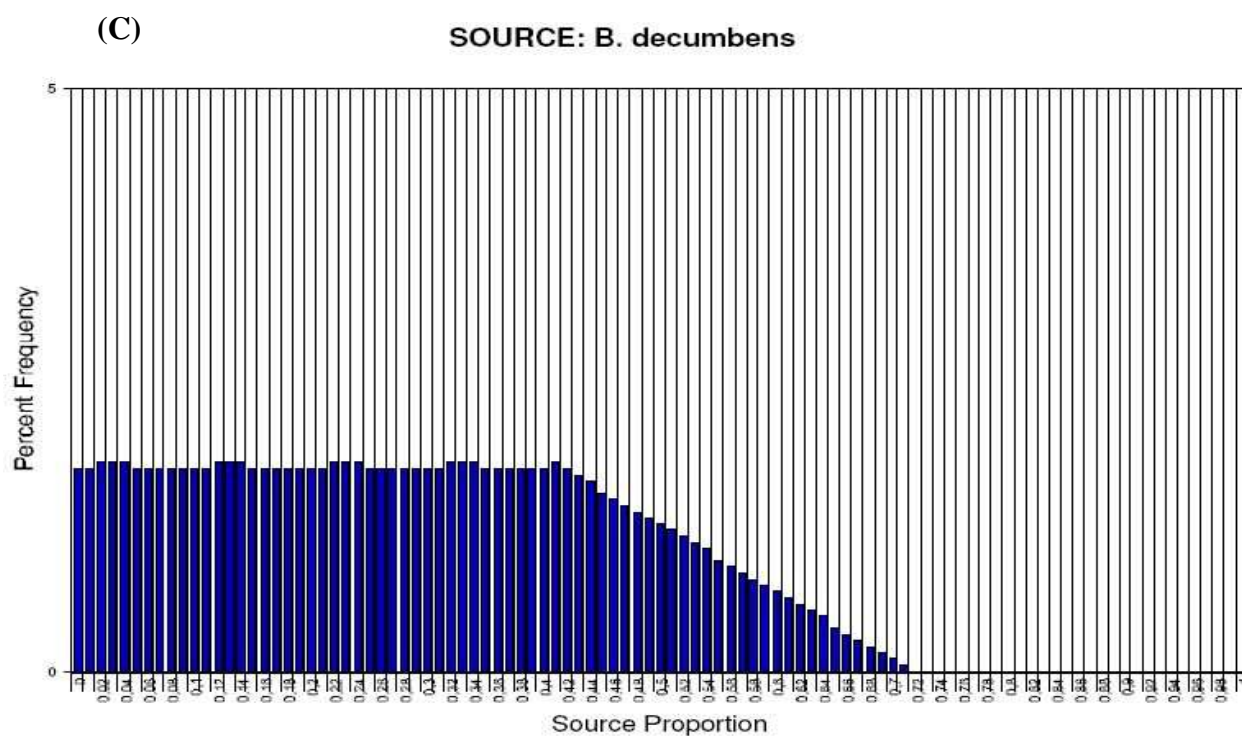


Figure 9: Origine de la source de carbone alternative sur sol E pour *Rhinocricidae* sp.
Proportion de la source de carbone *Brachiaria decumbens* (C) et *Cynodon dactylon* (D) dans la valeur de $\delta^{13}\text{C}$.

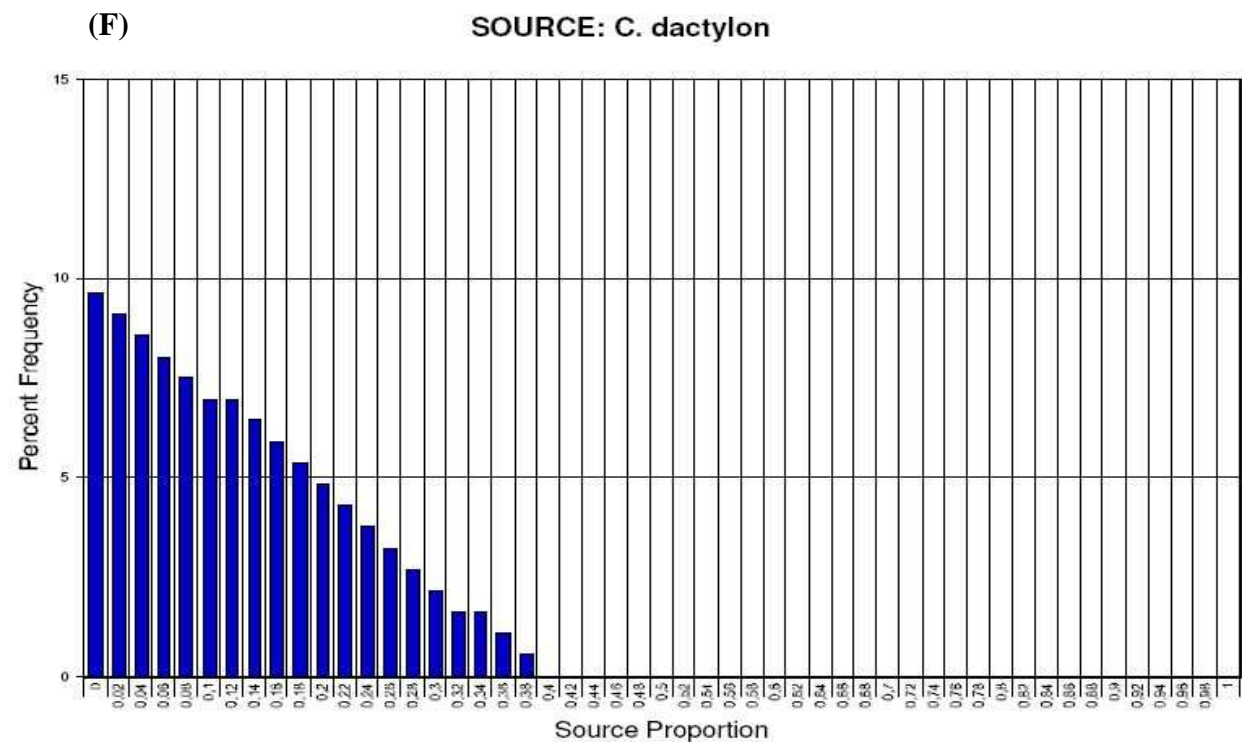
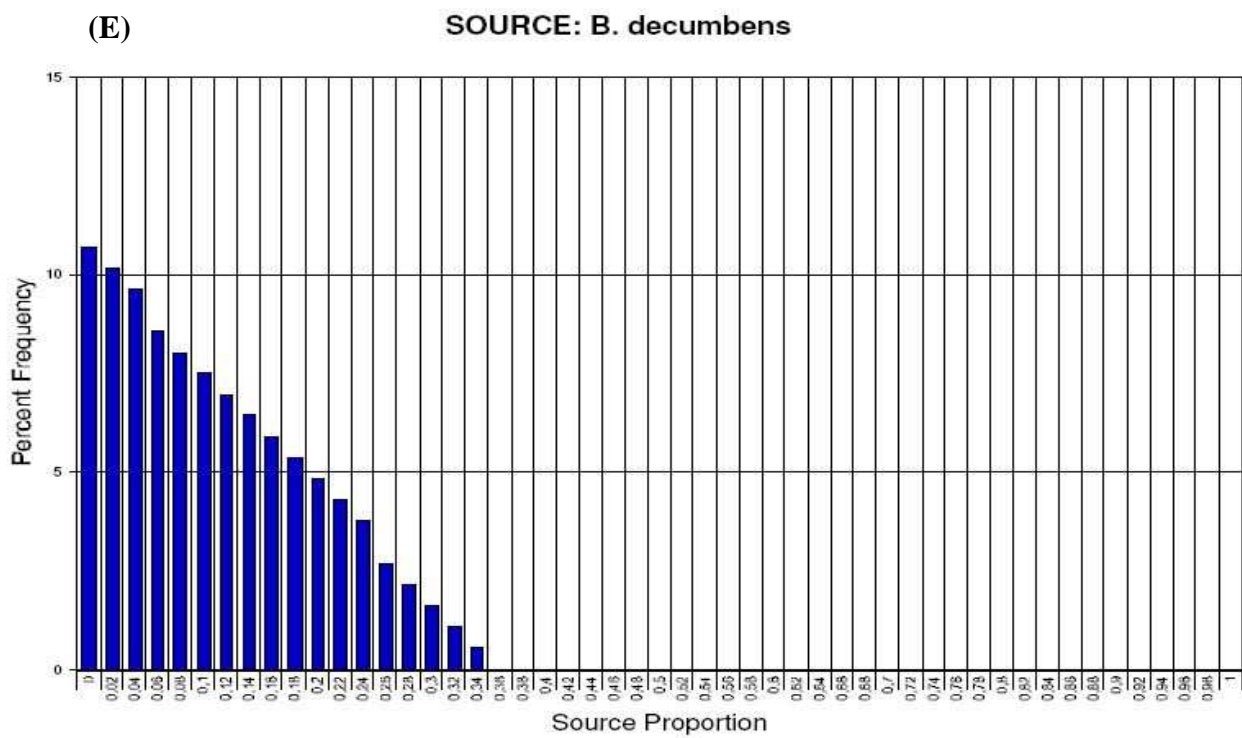


Figure 10: Origine de la source de carbone alternative sur sol E pour *Tenebrionidae* sp. Proportion de la source de carbone *Brachiaria decumbens* (E) et *Cynodon dactylon* (F) dans la valeur de $\delta^{13}\text{C}$.

Le bananier (*Musa acuminata*) apparaît nettement comme étant la source principale de carbone pour *Tenebrionidae sp.* sur sol enherbé. La part de cette source dans la valeur total du $\delta^{13}\text{C}$ de cette espèce se situe entre 64 et 100% avec une fréquence maximal pour une proportion égal à 66%. Les résultats pour *Rhinocricidae sp.* sont plus mitigés avec des valeurs pour la proportion de cette source se situant entre 22 et 58% avec des fréquences proches pour chaque valeur. L'observation qui peut être faite est que le bananier fait partie de l'alimentation de cette espèce. (**Figure 8**).

Les résultats concernant l'origine de la ressource alternative sur sol enherbé pour *Tenebrionidae sp* montrent que la proportion de source *B. decumbens* suit la même répartition que la proportion de *C. dactylon*. La différence entre ces deux sources s'observe aux niveaux des fréquences de leur proportion dans le $\delta^{13}\text{C}$. Ces fréquences sont légèrement inférieures pour *C. dactylon* signifiant que *B. decumbens* a une part plus importante que *C. dactylon* dans la valeur finale du $\delta^{13}\text{C}$ de *Tenebrionidae sp.* (**Figure 10**). Quant à l'origine de la ressource alternative sur sol enherbé pour *Rhinocricidae sp* la très faible différence entre la répartition des proportions de *B. decumbens* et la répartition des proportions de *C. dactylon* suggère que ces deux ressources sont intégrées avec la même importance (**Figure 9**).

3. Marqueurs moléculaires

3.1. Mise au point du protocole expérimental

L'association du couple d'amorce *c,d*, de "HotStarTaq *Plus* Master Mix Kit" et du programme PCR TrnL1 fournit la meilleur amplification parmi les combinaisons initialement testées (**figure 11**). Les résultats obtenus montrent cependant que l'amplification n'a pas fonctionné avec la même efficacité sur tous les échantillons testés. Ainsi l'amplification de ces mêmes échantillons a été testée avec le programme TrnL3 qui s'est révélé plus efficace. TrnL3 a donc été appliqué à l'amplification des séquences d'ADN extrait à partir des échantillons végétaux pour la réalisation de La librairie *trnL*. (**figure 12**).

Remarque: toutes les modifications des programmes PCR ont consisté en une augmentation de la température et du nombre des phases d'hybridations afin d'augmenter l'efficacité et la spécificité des hybridations des amorces sur les brins d'ADN.

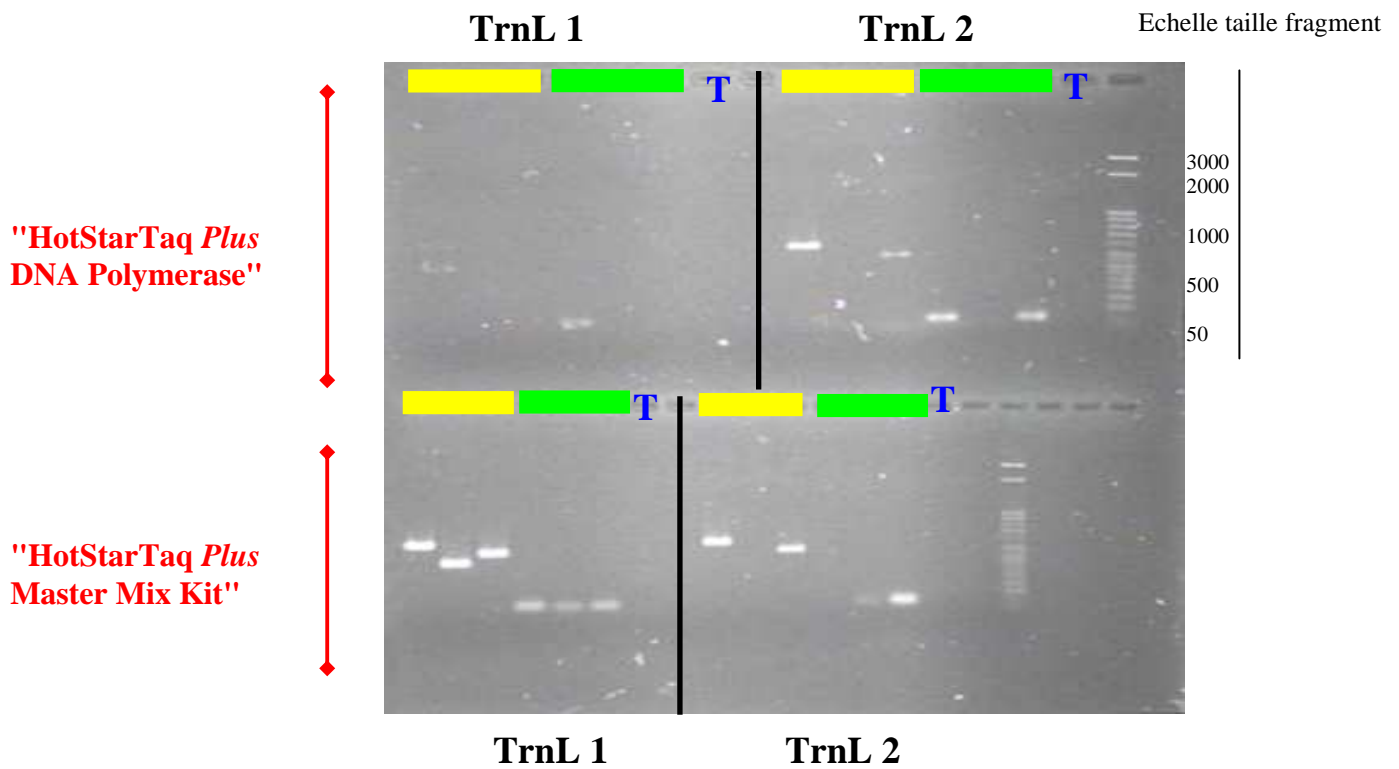


Figure 11: Analyse par électrophorèse des produits PCR testés. Les puits marqués en jaune contiennent de l'ADN extrait à partir d'échantillons de *Musa spp.*; en vert de *B. decumbens*. Les témoins "T" contiennent de l'eau.

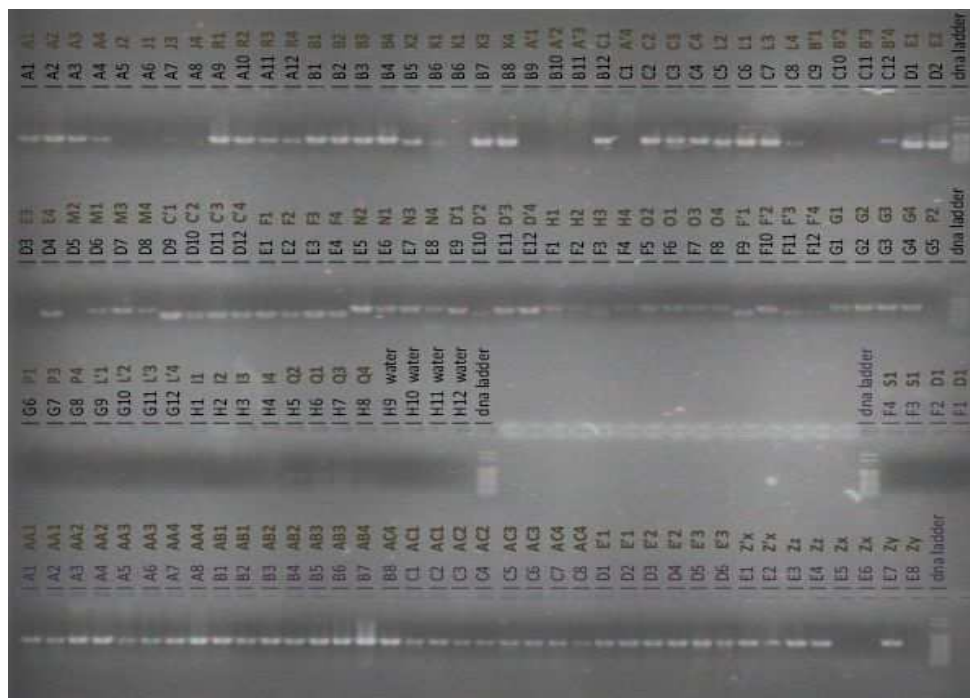


Figure 12: Détection par PCR des séquences trnL amplifiés pour les extraits d'ADN issus des échantillons végétaux (envoyées au séquençage). Le programme PCR est "TrnL 3" et le couple d'amorces est c,d. Chaque échantillon est identifié par un code lettre (représentant une espèce) et un code chiffre (nombre d'individu par espèce). Ces codes sont notés en marron. (Remarque: les codes notés en bleu réfèrent la position d'un échantillon sur la plaque PCR).

3.2. Librairie trnL

La librairie retenue après élimination des séquences de mauvaise qualité (amplification non complètes) comporte 26 séquences répartie en x taxons. Pour chaque espèce, la séquence présentant la meilleure qualité a été conservée. Les résultats montrent que toutes les séquences sont différentes à l'exception des séquences identifiées comme appartenant à la famille des Fabacées. Tous les représentants de cette famille, sauf l'individu noté "R", possèdent des séquences qui présentent un degré de similarité égal à 100% (données non présentées). Cependant la séquence de cet individu présente 100 % de similarité avec la séquence de l'individu "G" (*Ipomea sp.*). L'identification de l'individu "R" comme représentant de la famille des Fabacées a été obtenu par BLAST de sa séquence sur Genenbak®. Ce résultat suggère une erreur de détermination (fiabilité des séquences sur Genebank®).

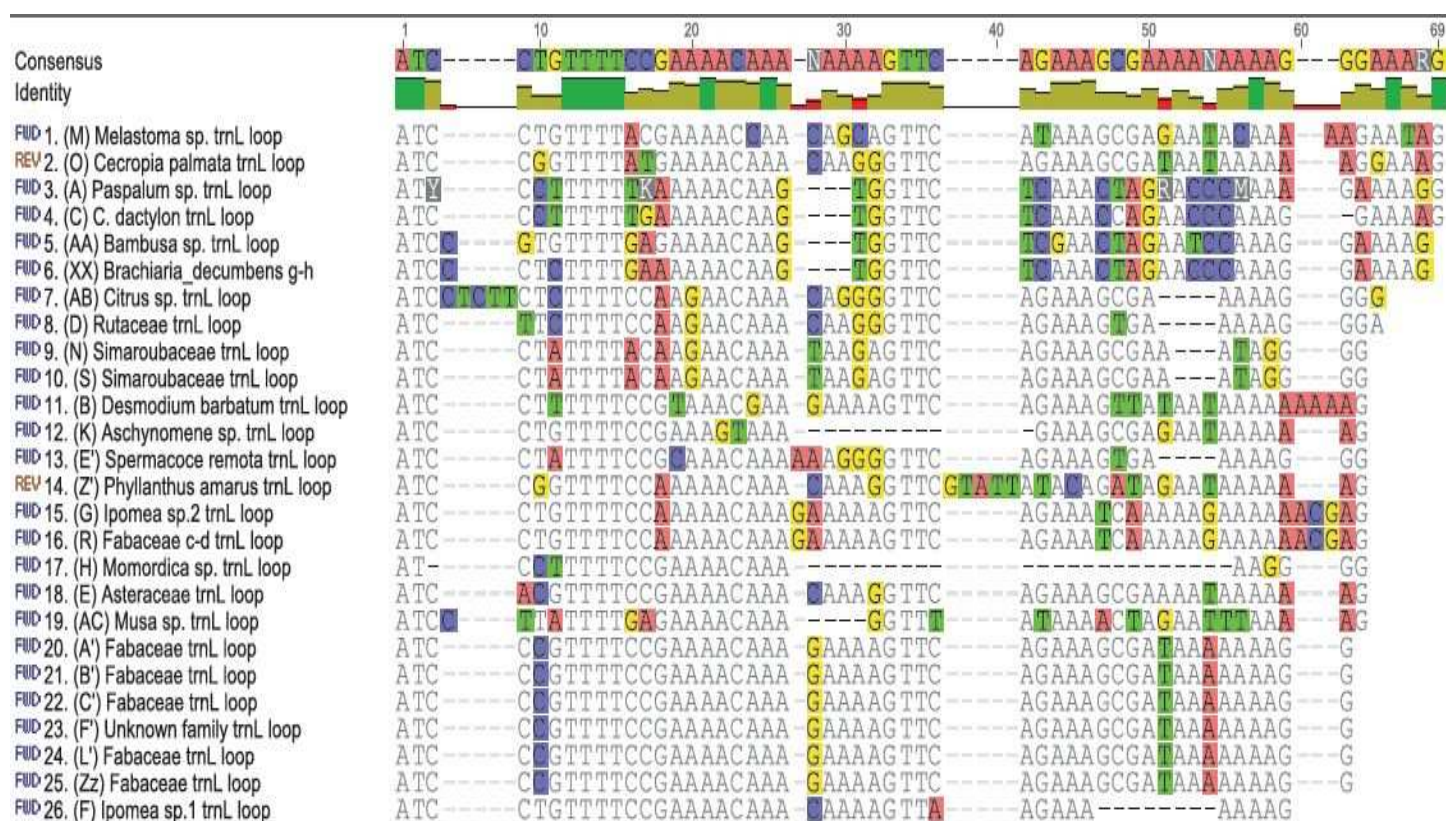


Figure 13: Librairie trnL pour le fragment "P6 Loop". La première ligne donne la séquence consensus, calculée de sorte à ce qu'elle possède un degré de similarité maximal avec toutes les autres séquences. La ligne "Identity" indique les nucléotides conservés à travers toutes les séquences (en vert) et les nucléotides qui diffèrent (en jaune) pour chaque position.

3.3. Amplification PCR avec amorces spécifiques

L'analyse de l'hybridation des amorces avec le logiciel Geneious® a permis de sélectionner le couple "m1" qui amplifie un fragment de 139 pb pour l'intron trnL chez *Musa spp.* (bananier) et le couple d'amorce "b2" qui amplifie un fragment de 394 pb chez *B. decumbens* pour ce même intron ; ces deux couples ne s'hybrident pas entre eux. (données non présentées.)

Les premières migrations des produits PCR issu de ces amplifications montrent des incohérences révèle la d'une part la présence de faux négatifs pour les témoins contenu de l'eau (présence d'une bande après révélation sous U.V.). Aussi à l'intérieur des tubes témoins "ADN *Musa spp.* + amorces b2" et "ADN *B. decumbens*+ amorce m13" de l'ADN a été amplifié (**figure 14**).

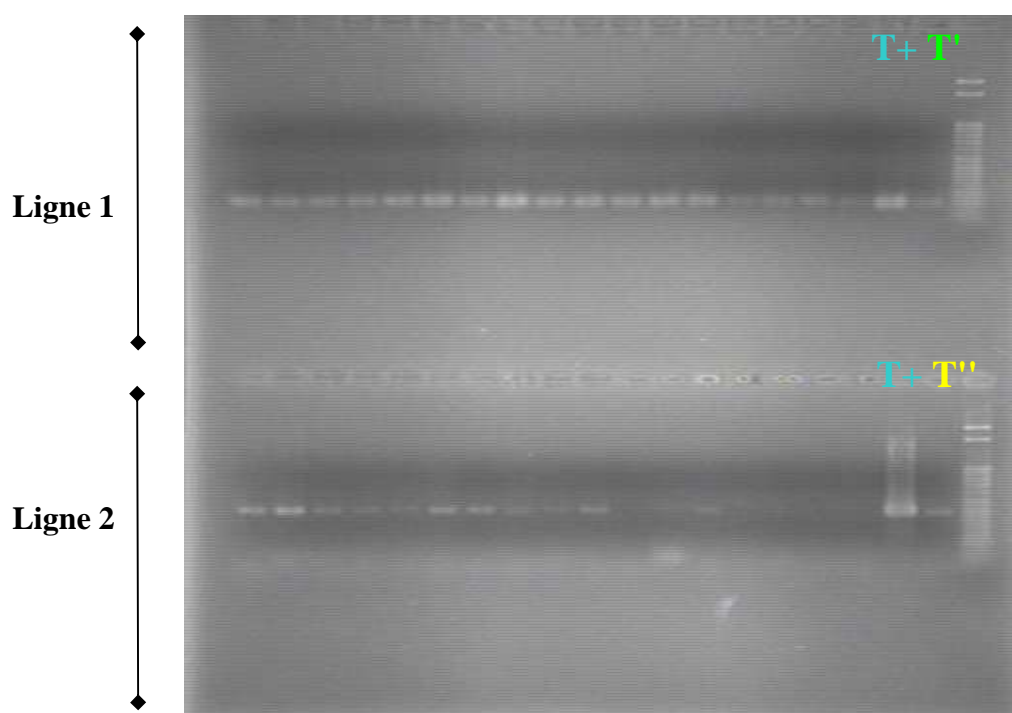


Figure 14: Analyse par électrophorèse des produits PCR amplifié par les amorces spécifiques m1 et b2. Les échantillons testés sont des extraits d'ADN issu de *Tenebrionidae sp.* sur sol E amplifié avec les amorces m1 (ligne 1) et b1 (ligne 2). Les témoins positifs sont notés en bleu, et les témoins négatifs T' contiennent "ADN *B. decumbens* + amorce m1" (en vert) et T": "ADN *Musa spp.* + amorce b2" (en jaune).

Bien que testée par le logiciel Geneious, la spécificité de ces couples d'amorces a été vérifiée expérimentalement. Les résultats (**figure 15**) montrent que le couple d'amorces m1

(spécifique de *Musa spp.*) a amplifié des séquences trnL à partir d'extraits ADN de *B. decumbens* et le couple d'amorce b2 (spécifique de *B. decumbens*) a amplifié des séquences trnL à partir d'extraits ADN de *Musa spp.* Les amorces ne sont donc pas spécifiques; par conséquent, l'identification des séquences végétales pour l'intron trnL dans les contenu stomacaux via cette méthode d'amplification n'a pas été poursuivi.

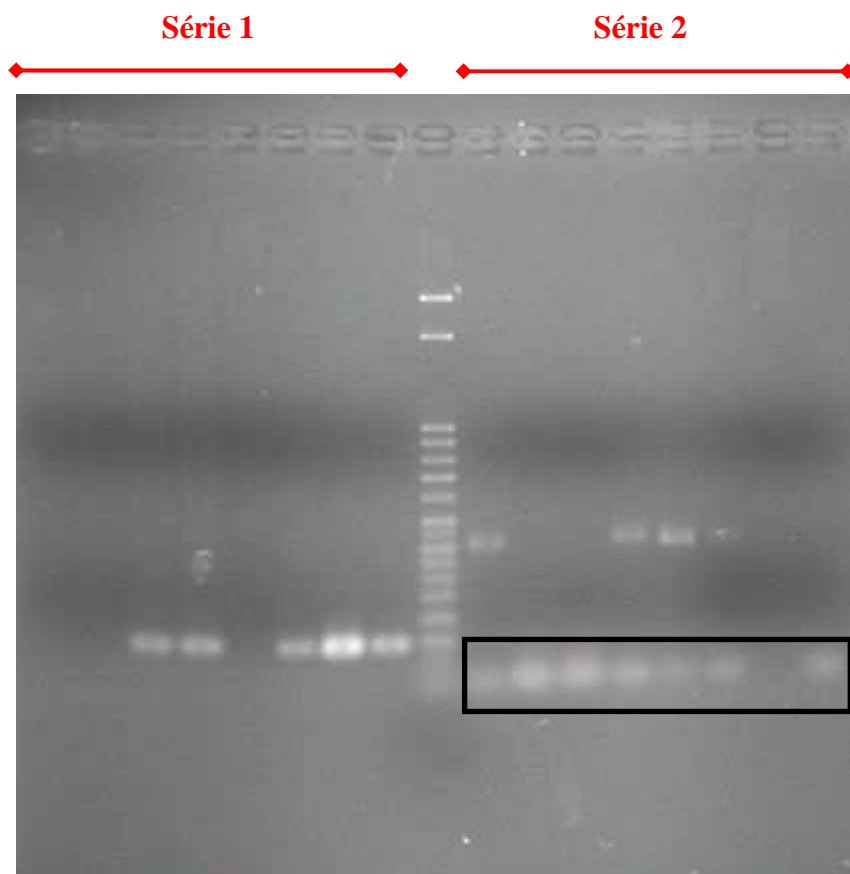


Figure 15: Détection par PCR des séquences trnL amplifiés par les couples d'amorces spécifiques. Amplification du fragment trnL avec m1 sur extrait d'ADN de *B. decumbens* (série 1) et amplification du fragment trnL avec b2 sur extraits d'ADN de *Musa spp.* (série 2). Remarque: les bandes d'une taille d'environ 50 pb au niveau de la série 2 (encadré noir) indiquent la présence d'homodimères ou hétérodimères d'amorces.

3.4. Séquençage 454

L'amplification des séquences des séquences d4ADN végétal extrait à partir des contenu stomacaux a utilisé le couple d'amorce *g,h* (voir Matériel et Méthodes, "choix des amorces"). Le programme PCR mis au point et retenu pour l'amplification de ces séquences est GH59 (analyse en cours, données non disponibles). Les délai d'obtention des résultats étant relativement long (8semaines), ils n'ont malheureusement pas pu être intégrés à ce rapport.

V. DISCUSSION

Analyses isotopiques

Les analyses isotopiques ont montré que la présence de la plante de couverture entraîne un décalage significatif des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ vers la valeur de la déviation en $\delta^{13}\text{C}$ de *Brachiaria decumbens* et/ou de *Cynodon dactylon* sur sol enherbé pour *Rhinocricidae sp.* et *Tenebrionidae sp.* Ces résultats montrent que ces deux espèces consomment la plante de couverture. Ils sont en accord avec leur mode d'alimentation connu. Ces espèces sont détritivores, elles se nourrissent de matière organique en décomposition. Dans le traitement "enherbé", *B. decumbens* en décomposition au sol est intégrée au régime alimentaire de ces deux espèces. Ce décalage a également été montré au cours d'études précédentes sur différents organismes (prédateurs omnivores) (Lavigne Alice 2007, Kulagowski Rémy, 2008, Mollot Grégory, 2009.). L'analyse a intégré, en plus du bananier et de la plante de couverture, une plante naturellement présente dans la bananeraie: *C. dactylon*. L'influence de cette dernière plante, par rapport à *B. decumbens* a pu être évaluée grâce aux résultats apportés par le logiciel IsoSource qui renseignent sur l'origine de la source de carbone présente chez les consommateurs. Ces résultats tendent à montrer que la consommation de *Brachiaria decumbens* domine sur *Cynodon dactylon* sur sol E. Pour tous les taxons testés la fréquence de *C. dactylon* est nettement inférieure sur sol enherbé. Ceci peut s'expliquer par l'abondance de *B. decumbens*, très nettement supérieur à *C. dactylon*. La plante de couverture *B. decumbens* semble avoir été intégrée en tant que ressource basale consommée par les *Rhinocricidae sp.* et *Tenebrionidae sp.* de l'agroécosystème. Les résultats ne montrent pas de différence significative dans l'origine du carbone consommé pour *Blattidae sp.* et *Polytus sp.* Le petit charançon (*Polytus sp.*) est étroitement associé au bananier, et peut constituer un prédateur pour *C. sordidus*. Par contre, les blattidés sont a priori détritivores, et ces résultats sont en désaccord avec ce mode d'alimentation, nous aurions dû observer une différence dans les valeurs de carbone entre les deux traitements pour cette espèce. Le nombre de répétition très faible pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas décelé cette différence.

Les résultats obtenus concernant l'azote ne permettent pas de conclure sur l'augmentation ou une modification de niveaux trophiques, traduisant une complexification du réseau trophique sur sol enherbé. Cependant concernant les valeurs de déviation pour le $\delta^{15}\text{N}$, un résultat peut être pris en compte. La valeur de $\delta^{15}\text{N}$ de *Rhinocricidae sp.* est plus élevée sur

le sol nu que sur le sol enherbé (respectivement de 3.85% et 2.78%, $p\text{-val}=0.053$). Cette différence peu significative est difficilement interprétable (les Iules ne sont pas prédatrices).

Marqueurs moléculaires

La méthode du code barre ADN a été utilisée pour l'étude des régimes alimentaires. Le principe de cette méthode est de créer une librairie référençant toutes les espèces de plantes présentes dans la bananeraie, et de confronter les séquences présentes dans les contenus stomacaux à cette librairie pour déterminer quelles espèces végétales ont été consommées. Dans la librairie, chaque espèce de plante est représentée par sa séquence pour l'intron trnL (UAA). L'étude de la librairie ainsi obtenue a mis en évidence l'une des limites connue quant à l'utilisation de ce gène chloroplastique et plus particulièrement du petit fragment la "P6 Loop" comme code barre ADN. Il s'agit du pouvoir de résolution de ce gène dans la discrimination taxinomique pour les taxons phylogénétiquement proches (relations intraspécifique) mais aussi pour des taxons à des rangs supérieurs au sein de certaines familles (Taberlet *et al.*, 2007). Cette limite a été mise en évidence au cours de ce travail au sein de la famille des fabacées. Tous les représentants de cette famille ont exactement la même séquence. (100% de degrés de similarité). Le marqueur trnL n'apparaît pas comme un bon code barre pour ce taxon. Concernant tous les autres taxons utilisés pour créer la librairie des espèces végétales de la bananeraie, la séquence trnL est différente. Ce seul code barre ADN suffit pour discriminer toutes les espèces les unes par rapport aux autres et de les identifier avec une séquence, propre à chacune d'elle.

L'un des seuls inconvénient, mais extrêmement important, dans l'utilisation de l'intron trnL (UAA) est sa faible résolution en comparaison avec plusieurs autres régions chloroplastiques non codante (Kress *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2005; Taberlet *et al.*, 2007). L'intron trnL ne serait pas le meilleur candidat pour la caractérisation des espèces de plantes et pour les études phylogénétiques parmi des taxons relativement proches. Aussi, il apparaît évident que ce problème de résolution est d'autant plus prononcé lorsque c'est le petit fragment de la P6 Loop (amplifiée avec les amorces *g* et *h*) qui est choisit comme séquence code barre. Les études précédemment menées ont mis en évidence cette faible résolution particulièrement au niveau intraspécifique. Cette partie du gène semblerait donc évoluer lentement et ne présente donc pas suffisamment de variations à des niveaux taxinomiques bas (espèces..) en comparaison avec d'autres régions non codantes de l'ADN chloroplastique.

Cependant, cette faible résolution est compensée par de nombreux avantages. Tout d'abord les amorces *c*, *d*, *g* et *h* sont extrêmement bien conservées, des Bryophytes aux Angiospermes pour les amorces *c* et *d* et des gymnospermes aux Angiospermes pour *g* et *h*; recouvrant ainsi une part importante des végétaux. L'universalité de ces amorces est un facteur crucial pour les études de détermination systématique. Aussi, ces couples d'amorces présentent l'avantage d'être plus efficaces lors d'amplification de *trnL* sur plusieurs espèces au cours de la même PCR (pratiqué au cours de cette étude pour PCR avec amorces spécifiques). Contrairement à d'autres couple d'amorces précédemment utilisés pour ce genre d'étude notamment *h1aF* et *h2aR* (Poinard et *al.*, 1998). Par ailleurs, le nombre de séquences de l'intron *trnL* (UAA) dans les bases de données est très important permettant une identification robuste.

Les couple d'amorces créés pour cette étude se sont révélées non spécifiques, les huit couples amplifiant des séquences présentes chez *Musa spp.* et *Brachiaria decumbens*. Ces résultats révèlent qu'il est difficile de mettre au point des amorces spécifiques pour une espèce donnée à partir de ce gène. Ces amorces spécifiques sont donc capables de s'hybrider sur les mêmes régions du gène chloroplastique pour les deux espèces testées.

Certains résultats obtenus au cours de la mise en place du protocole expérimental et lors des amplifications PCR obtenus soulèvent également un problème récurrent dans l'expérimentation au laboratoire. La présence de faux positifs a souvent été observée. Ces tubes témoins contenant de l'eau à la place de l'ADN ont révélés, après migration sur gel et révélation sous U.V., la présence d'ADN. Bien que de nombreuses précautions ai été prises, des contaminations ne sont pas à écarter. Ces contaminations peuvent survenir à différents stades. Lors de l'échantillonnage sur le terrain par exemple, la présence de fibre de bananier sur les pattes et des pièces buccales de certaines espèces piégées dans les pseudos tronc a souvent été observée (*C. sordidus*, *Polytus sp.*, *Tenebrionidae sp.*, *Chrysomelidae sp.*). Ces fibres ont été retirées avant les dissections mais il n'est pas exclu que certains morceaux soient restées, biaisant les résultats sur la composition du régime alimentaire. Au laboratoire, des contaminations croisées entre différentes espèces peuvent avoir eu lieu lors des manipulations des échantillons par l'expérimentateur au cours des extractions d'ADN par exemple ou encore lors des préparations des plaques PCR. La contamination du matériel expérimental (tubes contenant la Taq, les amorces...), peut être du à l'expérimentateur ou à une contamination ultérieure dans la conception même des produits. Pierre Taberlet a montré la présence d'ADN

dans des kits d'extraction d'ADN (Qiagen®) avant d'être utilisées (communication personnelles).

Séquençage 454

Via la méthode du séquençage 454, toutes les séquences amplifiées sont accessibles, quelques soit leur importance quantitative. Les données ainsi obtenues permettent de caractériser de manière exhaustive le régime alimentaire (qualitatif) des spécimens échantillonnés. L'identification des liens trophiques est alors possible (quels consommateurs pour quelles ressources) et les interactions interspécifiques peuvent être identifiées (consommation directe/indirecte). La nature du régime alimentaire des herbivores est directement accessible par BLAST des séquences d'ADN présentes dans leur contenu stomacaux sur les séquences de la librairie TrnL. La comparaison des régimes alimentaires entre les différents taxons d'un même écosystème permet de déterminer s'il existe une interaction entre eux. Dans le cas des herbivores la mise en évidence de similarités dans les régimes alimentaires pourrait indiquer que différentes espèces possèdent une ressource basale commune. Dans ce cas, l'existence d'une compétition pour la ressource peut être inférée (interaction interspécifique indirecte).

L'utilisation du pyroséquençage combiné au code barre ADN est une méthode très efficace pour la détermination des espèces présentes dans les contenus stomacaux. Cependant cette méthode ne fournit pas d'information quantitative. Le fragment *trnL* utilisé est un fragment de gène chloroplastique. Cependant, la quantité de chloroplaste varie selon le tissu végétal considéré; une feuille contient plus de chloroplastes qu'une racine. Les espèces consommant des tissus avec une faible quantité de chloroplaste peuvent ne pas être identifiées comme consommateur d'une ressource. Aussi le degré d'herbivorie d'une espèce sur une ressource n'est pas mesuré. Une espèce ne se nourrissant que très peu de bananier (ressource alternative), apparaîtra dans les analyses avec la même importance que le charançon.

Influence de la plante de couverture et contrôle des bioagresseurs

Les résultats concernant la biodiversité de la bananeraie sur le sol nu et le sol enherbé montrent une diminution importante de la diversité et des abondances spécifiques des espèces échantillonnées. La présence de la plante de couverture *Brachiaria decumbens* (et plus généralement d'une végétation diversifiée et abondante) peut augmenter le nombre de d'espèces herbivores en favorisant leur développement (Duyck et al., 2010). En effet une végétation plus abondante peut offrir de nouvelles niches écologiques et les plantes peuvent être utilisées comme source d'alimentation alternative. Cette augmentation de la densité des herbivores dans le réseau trophique peut augmenter le nombre de prédateurs (control "bottom up" dans l'écosystème et *in fine*, le control "Top Down" des bioagresseurs (Barberi et al. 2010, Wise et al., 2006).

Face aux problèmes liés à l'utilisation de produits chimiques (persistance, toxicité...), la lutte contre les bioagresseurs par des mécanismes de régulations naturelle est mise en avant. Des études sur l'existence de prédateurs naturelles du charançon ou de compétiteurs (pour la ressource) sont les axes d'études privilégiés. Actuellement aucun parasitoïde de *C. sordidus* n'a été trouvé, la lutte biologique à l'aide d'arthropodes prédateurs est considérée comme le meilleur moyen de contrôler ce ravageur (Abera-Kalibata et al., 2006; Gold et al., 2001). Les ennemis naturels, potentiellement capables de se nourrir des stades immatures de *C. sordidus* dans les bulbes, sont les plus susceptibles de convenir comme agent de lutte biologique. Les fourmis sont de plus en plus reconnu comme étant d'importants prédateurs dans les systèmes agricoles (Way et Khoo, 1992; Perfecto et Castenieras, 1998 cités par Abera-Khalibata et al., 2008) notamment dans les systèmes bananiers (Gold et al., 2001). Elles ont en effet la possibilité de maintenir des niveaux élevés d'approvisionnement (la satiété n'affecte pas la prédation et les excès de nourritures sont stockés dans le nid). Certaines espèces qui prédatent les œufs dans les bulbes infestés pourrait réduire les dommages causés par les larves de *C. sordidus* après éclosion (Abera-Kalibata et al., 2007, 2008). Des fourmis de la famille des Myrmicinae ont déjà été utilisées pour contrôler le charançon du bananier à Cuba (Castenieras et Ponce, 1991; Perfecto et Castenieras, 1998 cités par Abera-Khalibata et al, 2008). Les fourmis ont permis de réduire de 60% à 70% la population de *C. sordidus*. Les espèces de fourmis piégées sur la parcelle expérimentale (donnée non montrée) sont *Solenopsis geminata* et *Wasmania auropunctata* pourrait être étudié dans ce sens. Les interactions entre ces deux espèces et *C. sordidus* ont

fait l'objet d'une récente étude (Mollet et al., 2010), et les résultats obtenus suggèrent un lien causal entre l'abondance de *S. geminata* et le taux de prédation sur les œufs de *C. sordidus*.

IV. PERSPECTIVES , CONCLUSION

Les résultats apportés par les analyses isotopiques pourrait être menée en intégrant en plus des données de *Musa spp.*, *Brachiara decumbens* et *Cynodon dactylon*, les valeurs isotopiques de la totalité des espèces végétales présentent dans la bananeraie. Les informations concernant la caractérisation de l'origine du carbone chez les herbivores, associées aux résultats obtenus par séquençage de code barre ADN, augmenteraient la robustesse des résultats.

La recherche d'amorces spécifiques notamment pour le bananier, est une voie à poursuivre. L'amplification de ce seul fragment à partir des contenus stomacaux permettrait d'avoir un aperçu direct de l'identité d'autre bioagresseur du bananier ou encore de compétiteurs potentiels du charançon pour la ressource. Dans le cadre de ces études, de tels résultats sont capitaux pour l'élucidation des interactions trophiques, et par extension pour la caractérisation de la structure et du fonctionnement de l'agroécosystème.

L'utilisation du code barre ADN pour l'identification standardisé des espèces est une méthode de plus en plus utilisée dans l'étude des régimes alimentaires et plus généralement dans les études de détermination systématique (Valentini et al., 2008). L'intron *trnL* souffre d'un manque de résolution pour des études systématiques au sein de groupes taxinomiques fortement apparentés et pour des taxons de rangs supérieurs (famille); résultats mis en évidence au cours de cette étude. Plus généralement, la détermination systématique à partir de caractères moléculaires s'avère plus délicate chez les plantes. Dans le règne animal, en revanche, l'utilisation du gène codant pour la cytochrome oxydase I (COI), comme marqueur moléculaire a largement fait ses preuves et est communément retenue pour les études systématiques. Dans l'optique de palier au manque de résolution du code barre *trnL* dans l'identification de certaines espèces, l'utilisation d'autres marqueurs moléculaires est à explorer. Récemment, un nouveau code barre ADN pour la détermination systématique des espèces végétale a été proposé. Il s'agit du code barre "matK" ("*megakaryocyte-associated*

tyrosine-protein kinase") qui se situé dans la partie intronique du gène chloroplastique *trnK* (Savolainen et al., 2008). Des recherches ont montrés que le gène *matK* peut être utilisé pour différencier 90% des plantes. Ce gène possède une variabilité significative au niveau spécifique, des régions conservés en amont et en aval de sa séquence qui peuvent servir de site d'hybridation d'amorce pour l'amplification par PCR, une séquence de courte taille facilitant l'extraction et l'amplification de l'ADN (W. John Kress and David L. Erickson, 2008). L'utilisation combinée de ces deux codes barre (ou plus) peut apporter des résultats plus robustes et résoudre les problèmes d'identification taxinomiques au niveau intraspécifique et à des rangs taxinomiques supérieurs pour lesquels l'inefficacité du code barre *trnL* a été décrite. (Taberlet et al., 2006)

Dans l'optique de reconstruire la totalité du réseau trophique d'une bananeraie, il est nécessaire de s'intéresser aux autres acteurs de l'agroécosystème. La prise en compte des autres niveaux trophiques, les consommateurs secondaires et les espèces omnivores, fait l'objet d'une étude en cours (thèse, Gregory Mollot, CIRAD).

Références Bibliographiques

- Abera-Kalibata A.M., Gold C.S., Van Driesche R.G. (2008) Experimental evaluation of the impacts of two ant species on banana weevil in Uganda. *Biol Control* **46**:147-157
- Abera-Kalibata A.M., Gold C.S., Van Driesche R.G. Ragama P.E., (2007) Composition, distribution, and relative abundance of ants in banana farming systems in Uganda. *Biol Control* **40**:168-178
- Barberi P., Burgio G., Dinelli G., Moonen A.C., Otto S., Vazzana C., Zanin G., (2010) Functional biodiversity in the agricultural landscape: relationships between weeds and arthropod fauna. *Weed Res* **50**:388-401
- Casteñeras A.T. et Ponce E. (1991) Efectividad de la utilización de *Pheidole megacephala* (Hymenoptera: Formicidae) en la lucha biológica contra *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). *Protección de Plantas* **1**: 15-21
- Corse E., Costedoat C., Chappaz R., Pech N., Martin J-F., Gilles A. (2009) A PCR-based method for diet analysis in freshwater organisms using 18S rDNA barcoding on faeces. *Molecular Ecology Resources* **10**: 96-108
- Deagle B.E., Kirkwood R., Jarman S.N. (2009) Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. *Molecular Ecology* **18**: 2022-2038
- Delano J., Schimdt A-M. (2004) Use of an intron region of a chloroplast tRNA gene(trnL) as a target for PCR identification of species food crops including sources of potential allergens. *Food Research International* **37**: 395-402
- Delvare G. et Aberlenc H.P. (1989). Insectes d'Afrique et d'Amérique tropicale. Clés pour la reconnaissance de familles. CIRAD, Montpellier 298 p.
- Duyck P-F., Lavigne A., Vinatier F., Achard R., Okolle J.N., Tixier P. (2011) Addition of a new resource in agroecosystems: Do cover crops alter the trophic positions of generalist predators? *Basic and Applied Ecology* **12**:47-55
- Duyck P-F., Pavoine S., Tixier P., Chabrier C., Quénéhervé P. (2009) Host range as an axis of niche partitioning in the plant feeding nematode community of banana agroecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 1139-1145
- Elton C. (1927) Animal Ecology. Sidgwick & Jackson, London, UK
- Fumanal B., Martin J-B., Bon M.C. (2005) High throughput characterization of insect morphocryptic entities by a non-invasive method using direct-PCR of fecal DNA. *Journal of Biotechnology* **119**: 15-19

- Gold C.S., Pena J.E., Karamura E.B. (2001) Biology and integrated pest management for the banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). *Integrated Pest Management Review* **6**:79-155
- King R.A., Read D.S., Traugott M., Symondson W.O.C. (2008) Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology* **17**: 947-963
- Meusnier I., Singer A.C. Gregory, Landry J-F., Hickey D. A., Hebert P.D.N., Hajibabaei M., (2008) A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics* **9**: 214
- Pegard A., Miquel C., Valentini A., Coissac E., Bouvier F., François F., Taberlet P., Engel E., Pompanon F. (2009) Universal DNA- Based Methods for Assessing the Diet of Grazing Livestock and Wildlife from Feces. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 5700-5706
- Ponsard S., Arditi R. (2000) What can stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) tell about the food web of soil macro-invertebrates? *Ecology* **81**:852-864
- Post D.M. et Takimo G. (2007) Proximate structural mechanisms for variation in food-chain length. *Oikos* **116** **5**: 775-782
- Soisen E.M., Valentini A., Coissac E., Miquel C., Gielly L., Brochmann C., Brysting A.K., Sonstebo J.H., Ims R.A., Yoccoz N.G., Taberlet P; (2009) Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition on complex plant mixtures. *Frontiers in Zoology*, 6-16
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Miquel C., Valentini A., Vermet T., Corthier G., Brochman C., Willerslev E. (2006) Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research* **Vol. 35, No.3**
- Taberlet,P., Gielly,L., Pautou,G. and Bouvet,J. (1991) Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**, 1105–1109.
- Valentini A., Miquel C., Ali Nawaz M., Bellemain E., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Cruaud C., Nascetti G., Wincker P., Swenson J.E., Taberlet P. (2009) New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trnL* approach. *Molecular Ecology Resources* **9**: 51-60
- Valentini A., Pompanon F., Taberlet P. (2008) DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution* **1026** p8.
- Vander Zanden M.J., Rasmussen J.B. (1999) Primary consumer $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology* **4**: 1395-1404

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARNt : Acide Ribonucléique de transfert

BET : Bromure d'ethidium

BLAST : Basic Local Alignment Tool

CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

matK : megakaryocyte-associated tyrosine-protein kinase

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

trnL : région du gène chloroplastique *trnL* codant pour l'ARNt de la leucine. (Acronyme publié par Holmgren et Holmgren (2008).

UV : Ultraviolet

Annexes

ANNEXE 1: Localisation du site d'étude Rivière Lézarde (A) et schématisation de la parcelle expérimental (B).



(B)



E	Asteraceae	-	BLAST de la séquence sur Genebank®
F	Fabaceae	-	BLAST de la séquence sur Genebank®
A'	Fabaceae	-	BLAST de la séquence sur Genebank®
B'	Fabaceae	-	BLAST de la séquence sur Genebank®
C'	Fabaceae	-	BLAST de la séquence sur Genebank®
R	Fabaceae	-	BLAST de la séquence sur Genebank®
L'	Fabaceae	-	BLAST de la séquence sur Genebank®
ZZ	Fabaceae	-	BLAST de la séquence sur Genebank®
A	Poaceae	<i>Paspalum sp.</i>	Clé de détermination (Fournet, 2006)
B	Fabaceae	<i>Desmodium barbatum</i>	BLAST de la séquence sur Genebank®
C	Poaceae	<i>Cynodon dactylon</i>	Clé de détermination (Fournet, 2006)
D	Rutaceae	-	Clé de détermination (Fournet, 2006)
G	Convolvulaceae	<i>Ipomea sp.</i>	Clé de détermination (Fournet, 2006)
H	Cucurbitaceae	<i>Mormodica sp.</i>	Clé de détermination (Fournet, 2006)
J	Polypodiaceae	<i>Nephrolepis multiflora</i>	BLAST de la séquence sur Genebank®
K	Fabaceae	<i>Aschynomene sp.</i>	BLAST de la séquence sur Genebank®
L	Melastomataceae	<i>Clytemia Hirta</i>	Clé de détermination (Fournet, 2006)
M	Melastomataceae	<i>Melastoma sp.</i>	BLAST de la séquence sur Genebank®
N	Simaroubaceae	-	BLAST de la séquence sur Genebank®
S	Simaroubaceae	-	BLAST de la séquence sur Genebank®
O	Cecropiaceae	<i>Cecropia palmara</i>	BLAST de la séquence sur Genebank®
E'	Rubiaceae	<i>Spermacoce remota</i>	BLAST de la séquence sur Genebank®
F'	Famille inconnu	-	BLAST de la séquence sur Genebank®
Z'	Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus amarus</i>	Genebank®
XX	Poaceae	<i>Brachiaria sp.</i>	Clé de détermination (Fournet, 2006)
AA	Poaceae	<i>Bambusa sp.</i>	Clé de détermination (Fournet, 2006)
AB	Rutaceae	<i>Citrus sp.</i>	Clé de détermination (Fournet, 2006)
AC	Musaceae	<i>Musa spp.</i>	Clé de détermination (Fournet, 2006)

ANNEXE 3: Illustration des espèces végétales (A) et de la faune échantillonnée (B) retenues pour cette étude.

(A)

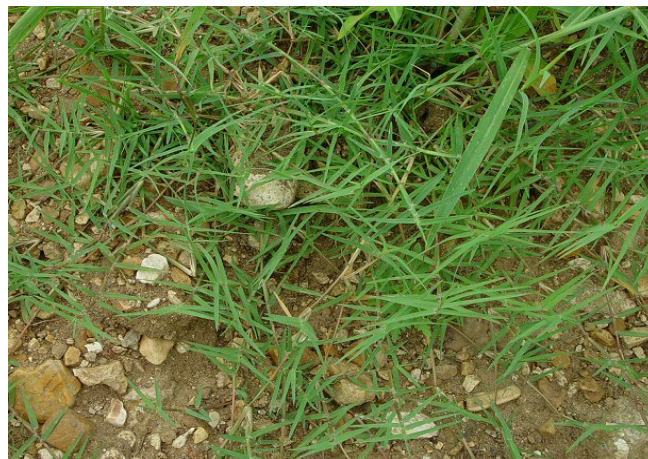
Famille

Espèce

Illustration

Poaceae

Cynodon dactylon



Poaceae

Brachiaria decumbens

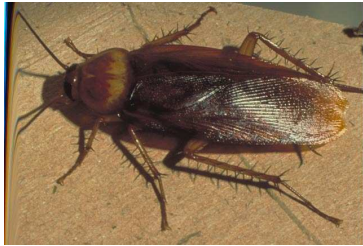






Musaceae

Musa spp.



(B)

Nom vernaculaire	Ordre	Famille	Genre et/ou espèce
Blatte	Blatoptera	Blattidae	 <i>Periplaneta americana</i>
Chrysomèle	Coleoptera	Chrysomelidae	 <i>Chrysomelidae sp.</i>
Charançon	Coleoptera	Curculionidae	 <i>Cosmopolites sordidus</i>
Polytus	Coleoptera	Curculionidae	 <i>Polytus sp.</i>
Ténébrionidé	Coleoptera	Tenebrionoideae	 <i>Tenebrionidae sp.</i>

Cicadelle verte Hemiptera Cicadellidae



Empoasca vitis

Punaise 1 Heteroptera Cydnidae



Cydnidae sp.

Punaise 2 Heteroptera Pentatomidae



Pentatomidae sp.

Iule Spirobolida Rhinocricidae



Rhinocricidae sp

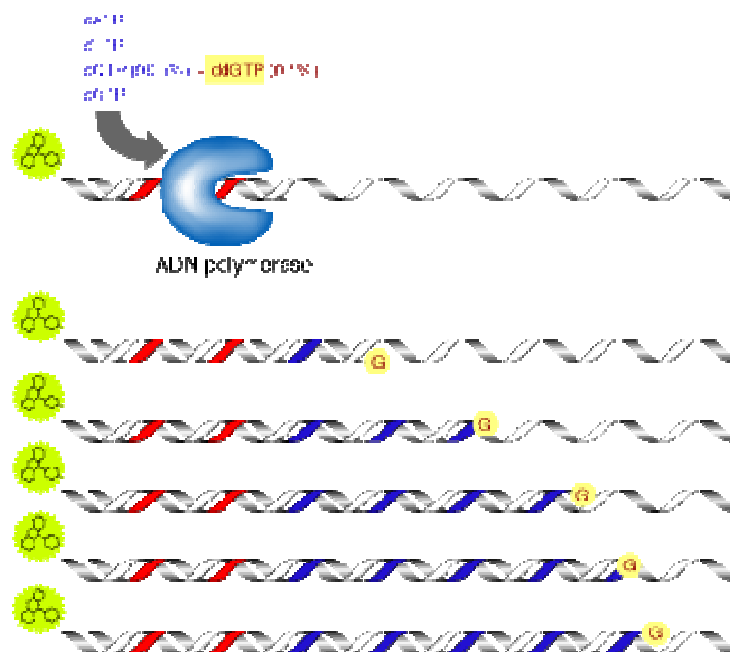
Grillon Orthoptera Grillonidae



Grillus assimilis

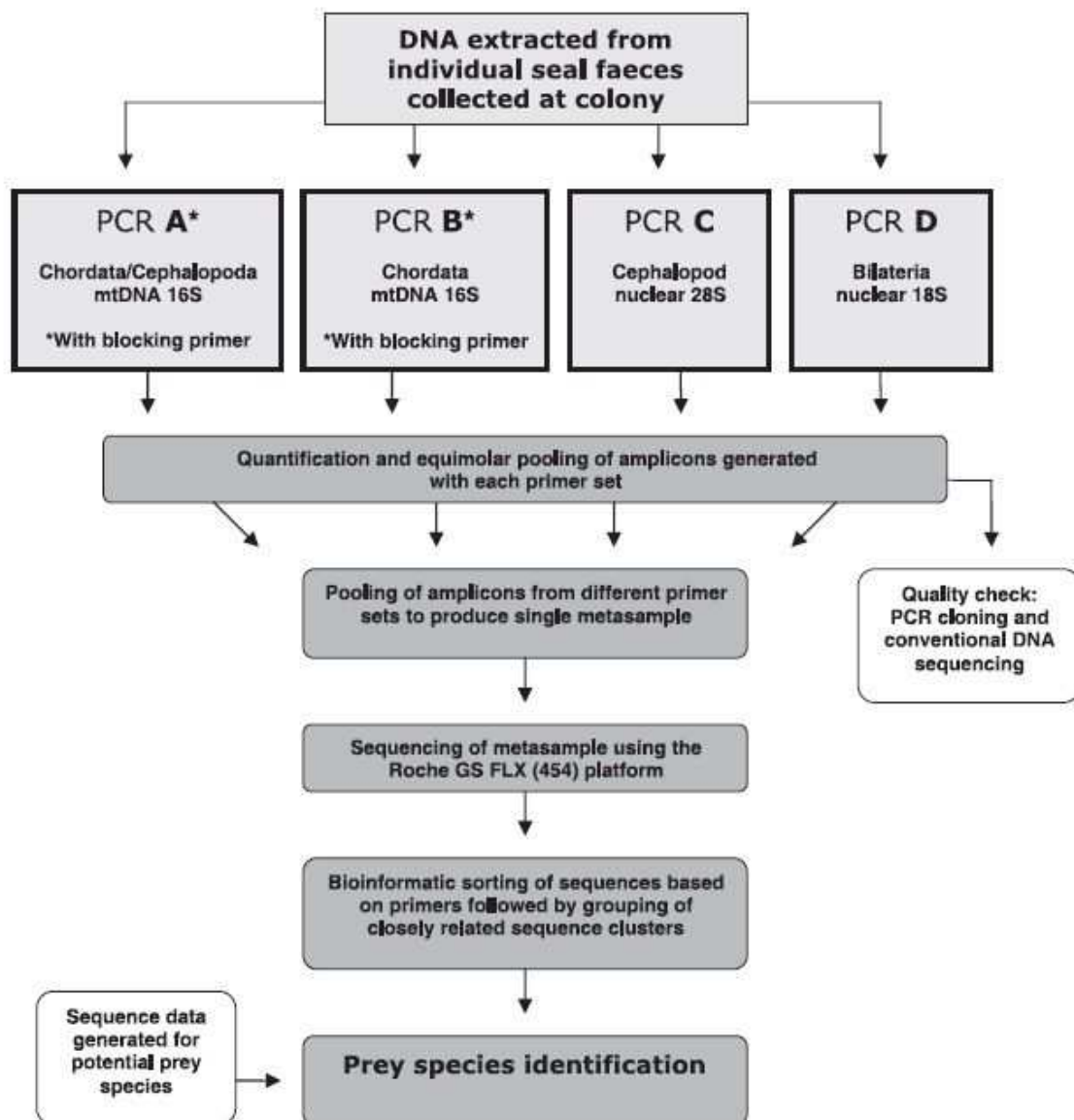
ANNEXE 4 (A): Séquençage par la méthode de Sanger.

Principe du séquençage par la méthode de Sanger. Les didésoxyribonucléotides (ici, le ddGTP, en jaune) sont incorporés mais bloquent statistiquement l'allongement de la chaîne là où les G sont normalement incorporés. Un traceur fluorescent (en vert clair) est attaché à l'extrémité de l'amorce de polymérisation et permet de détecter les fragments d'ADN synthétisés



ANNEXE 4(B): Séquençage 454 de Roche®, nouvelle technique de séquençage à haut débit, exemple d'application et protocole.

Le principe de cette technique (basé sur la méthode du pyroséquençage) consiste à lier une amorce à l'ADN cible de taille inférieure à 500 pb, puis à ajouter séquentiellement et dans l'ordre une base à partir de l'extrémité de l'amorce (Shapiro, 2008). La séquence est ainsi déduite en fonction de l'ordre d'incorporation des nucléotides sur l'ADN complémentaire de la cible néo synthétisée



(d'après Deagle et al., 2009)

Annexe 5: Présentation des amorces spécifiques créées pour cette étude.

Les amorces sont nommées avec un F ("Forward") et un R ("reverse"). Le nombre dans le code amorce indique la longueur du fragment trnL amplifié. Les séquences surlignées en gris correspondent aux couples m1 et b2 utilisé pour les amplifications au cours de cette étude.

Couple d'amorces	Code Amorces	Taille du fragment	Séquences 5' - 3'
b1	brak F 142	4402978	GGGCAATCCTGAGCCAAATCCCT
	brak R 142	4402979	GGAGTTCCACTGCCAACACAACG
b2	brak F 394	4402980	ACGTTGTGTTGGCAGTGGAACCTCC
	brak R 394	4402981	AGAGGGACTTGAACCCTCACGACT
b3	brak F 706	4402982	ACGTTGTGTTGGCAGTGGAACCTCC
	brak R 706	4402983	ACCAGCTGAGCTATCCTGACCCT
b4	brak F 838	4402984	GGGCAATCCTGAGCCAAATCCC
	brak R 838	4402985	TCCTCTGCTCTACCAGCTGAGCT
m1	musa F 139	4402986	CCGATTCCTGCTACCAACAAAACGT
	musa R 139	4402987	TGGGCAATCCTGAGCCAAATC
m2	musa F 496	4402988	TGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTT
	musa R 496	4402989	TGGGGATAGAGGGACTTGAACCTTC
m3	musa F 764	4402990	GTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGT
	musa R 764	4402991	ACCATTTCCCGTGCATCATCCCA
m4	musa F 842	4402992	AATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCT
	musa R 842	4402993	ATCCCGACCATTTCCTGTCATC